

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



TESIS DOCTORAL

Título

Diagnóstico diferencial del linfoma intestinal y la enfermedad inflamatoria crónica intestinal en biopsias endoscópicas caninas: aspectos clínicos, histopatológicos, inmunohistoquímicos y clonalidad de linfocitos (PCR)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Violeta Carrasco Pizarro

Directores

Antonio Rodríguez Bertos
Fernando Rodríguez Franco

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL



**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL LINFOMA
INTESTINAL Y LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA
CRÓNICA INTESTINAL EN BIOPSIAS
ENDOSCÓPICAS CANINAS: ASPECTOS
CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS,
INMUNOHISTOQUÍMICOS Y CLONALIDAD DE
LINFOCITOS (PCR).**

TESIS DOCTORAL

VIOLETA CARRASCO PIZARRO

Madrid, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

D. Antonio Rodríguez Bertos, con D.N.I. 2876989-B, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

D. Fernando Rodríguez Franco, con D.N.I. 2521510-C, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: "Diagnóstico diferencial del linfoma intestinal y la enfermedad inflamatoria crónica intestinal en biopsias endoscópicas caninas: aspectos clínicos, histopatológicos, inmunohistoquímicos y clonalidad de linfocitos (PCR)", ha sido realizada bajo su dirección y supervisión por D^a Violeta Carrasco Pizarro.

Revisado el presente trabajo, consideran que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

En Madrid, a 22 de Noviembre de 2012,

Antonio Rodríguez Bertos

Fernando Rodríguez Franco

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto GR-35/10-B-920603 para grupos de investigación, otorgado por el Vicerrectorado de Investigación y Política Científica, BSCH-Universidad Complutense de Madrid.

La autora ha disfrutado de una beca predoctoral del programa “Formación de Profesorado Universitario” (F.P.U.) concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Gobierno de España. Período Septiembre 2008 – Septiembre 2012.

Este estudio fue evaluado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid, con un informe favorable que se emitió con fecha de 30 de Septiembre de 2008.

A todos los que me habéis brindado
vuestro cariño y apoyo
a lo largo de este trabajo,
a todos los que me aportáis cada día,
y por los que merece la pena seguir hacia adelante.

AGRADECIMIENTOS

Estoy escribiendo estas letras, todavía incrédula de haber llegado hasta aquí. Han sido cuatro largos años de trabajo, de esfuerzo, de pruebas, de vueltas a empezar, de contratiempos, de pequeños proyectos, hasta que por fin empezó a tomar forma la idea que, con mucho trabajo, ha constituido esta tesis. He pasado por muchas fases, y a lo largo de ellas por mucha gente a la que me gustaría agradecer haber contribuido, desde dentro o fuera de la Universidad, a la realización de este trabajo.

En primer lugar quiero agradecer a mis dos directores de tesis, todo el tiempo y el esfuerzo dedicado, y todo lo que me habéis enseñado. Gracias Antonio por sacar tiempo de lo imposible para seguir adelante, gracias por tu amabilidad y tu apoyo en mis múltiples ideas. Gracias Fernando, por ser tan organizado, por estar siempre disponible y aportarme serenidad y constancia. Gracias a los dos por ser mis maestros en este importante ciclo de mi vida que de momento termina aquí.

Quiero agradecer a las profesoras de Histología: Belén, Pilar, Ximena, Cristina y María Ángeles, por considerarme una más desde el principio, por participar con tanto entusiasmo en la aplicación del Proyecto de Innovación, por apoyarme todo lo que podéis con la tesis; pero, sobre todo, por hacerme sentir valorada y apreciar mi labor. Trabajar con vosotras ha sido un verdadero placer. Especialmente me gustaría agradecer a Belén su constante apoyo en las últimas semanas. Sigo con el resto de profesores de Anatomía Patológica, porque todos me habéis, en algún momento, tendido la mano que necesitaba para solucionar alguna duda o para socorrerme en el laboratorio. Gracias Manolo, Marta, María, Carolina, Laura, Nines, Nani y Rosa. Gracias también a Pedro, Fernando, Vanesa, Ramón y Nacho, por vuestro trabajo, y por aportar humanidad a las horas pasadas en el laboratorio.

Muchas gracias a Ángel Sáinz, a Merche y al resto del Equipo Digestivo (Bernardo, Jacinto, y las internas que han pasado a lo largo de estos años). Y a Rafael Cediel y a Coro. Han sido muchos buenos momentos pasados, tanto en Consulta y en Quirófano de Endoscopia, como fuera de ellos. Gracias por enseñarme un montón de cosas, y por ser unas grandes personas.

Agradezco también al extinto Departamento de Apoyo a la Investigación del Área de Informática U.C.M., especialmente a Santiago Cano, por su maravillosa disposición, su excelente manejo de los datos estadísticos, y sus pacientes explicaciones. Gracias al personal de la Biblioteca y Hemeroteca, por vuestra profesionalidad y por la cantidad de artículos que me habéis conseguido. Gracias a Abby y a Javier por vuestra ayuda en los temas informáticos.

Gracias a Miguel Ángel Martínez, patólogo del Hospital Doce de Octubre, por su ayuda, porque pacientemente me recibió hace unos años, cuando surgía la idea de esta tesis, y me ha ofrecido todos sus conocimientos y su profunda experiencia en medicina humana. Muchas gracias.

Gracias a Beatriz, mi “hada madrina”, por brindarme la posibilidad de participar en el Proyecto de Innovación, y por apoyarme en infinidad de cosas a lo largo de esta tesis.

Gracias a mis compañeras y amigas a lo largo de estos cuatro años: Verónica, Susana y Mónica, son tantas cosas las que hemos compartido que no sabría por dónde empezar. Gracias de verdad, porque sé que aunque ahora empiece una nueva etapa, y no os tenga tan cerca todos los días, esta amistad no va a quedar aquí. También gracias a Alejandra y Tania, “las mayores”, que me han ayudado en tantas cosas. Gracias Alejandra por ser tan buena compañera de despacho.

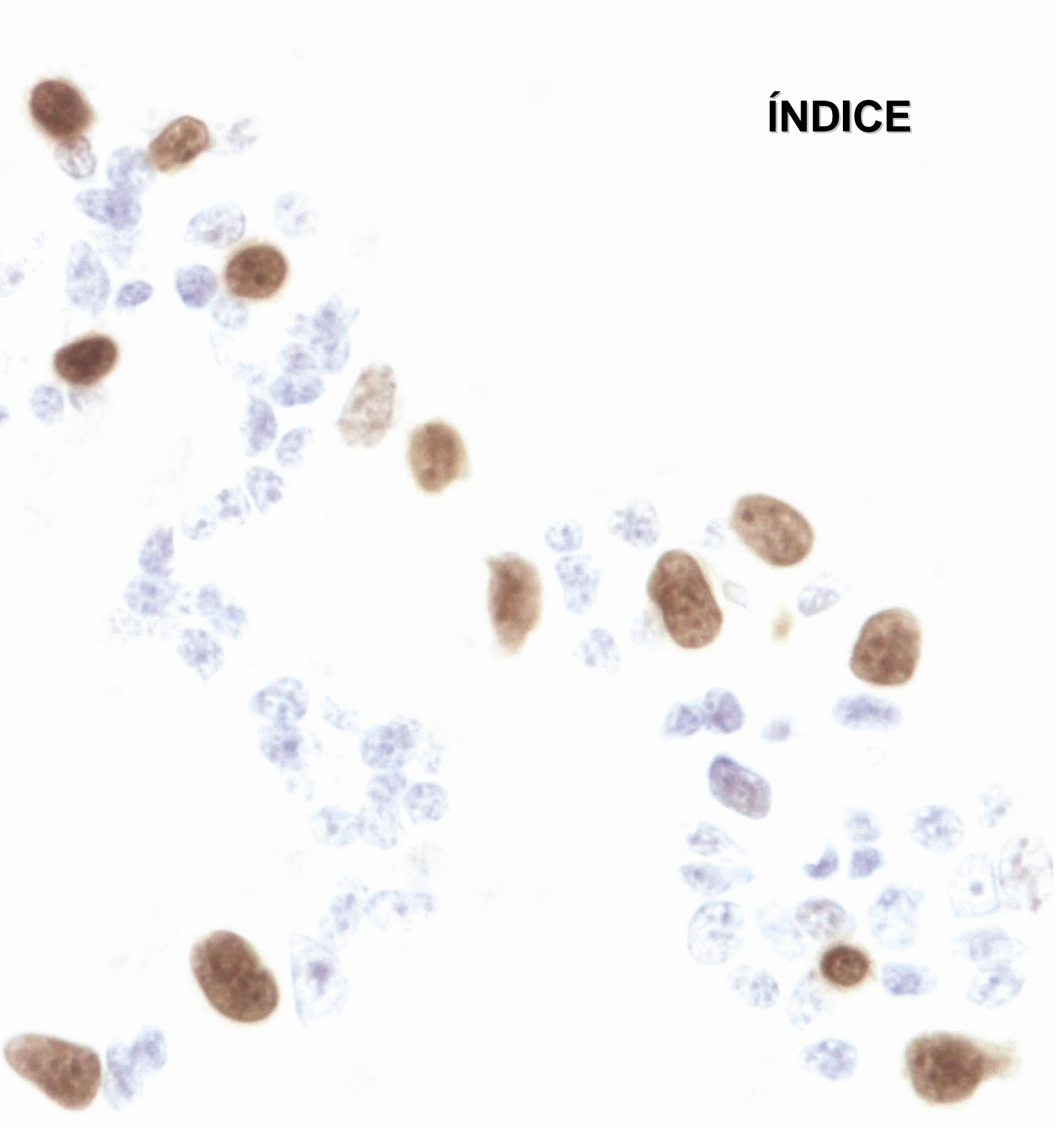
Sigo agradeciendo a unas personas que han sido esenciales para poder sacar esta tesis adelante. Gracias de corazón a Matti Kiupel, mi tutor de estancias en el Diagnostic Center for Population and Animal Health en la Universidad de Michigan (EE.UU.), que es para mí mi tercer director de tesis. Gracias por todo y por tanto, por creer en mí desde el principio sin tener ninguna referencia, por dedicarme tu tiempo, por enseñarme, por guiarme, por valorar tanto mi trabajo y por abrirme las puertas de tu laboratorio. Gracias también a Roger Mäes y a Annabel Wise por acogerme en el Laboratorio de Virología y hacerme sentir como en casa. Gracias a Tom, Kelly Cincinelly, Rodrigo, Madison, y al resto del personal del DCPAH por el trabajo bien hecho, por todas vuestras enseñanzas, y por tratar de que la extranjera se sintiese en casa y acogida desde el principio. Gracias especiales a Kelly, Kirk, Stacy y Michael por invitarme a vuestras familias y querer hacerme partícipe de vuestra cultura y vuestras celebraciones.

Gracias muy especiales a mi amiga Laura, por ser incondicional, y por compartir conmigo, la que más, este trabajo. Por leerse mis artículos, ayudarme a redactar e-mails formales (se le dan de lujo), venirse a Lansing y crear un hogar casi perfecto, ayudarme a encontrar un patólogo de medicina humana, leerse y sufrir gran parte de esta tesis, y tantas otras cosas. Gracias también a Alberto Cecilia, a Blanca y a Bea Casas, por la comprensión que dan los amigos veterinarios, y porque con amigos como éstos da gusto compartir la vida. Gracias a Iván por el diseño de la portada, con tu profesionalidad habitual. Gracias al resto de mis amigos, que aunque no lleguéis a entender de qué va esto, y os haya afectado mi encierro, os quiero agradecer que lo hayáis pasado conmigo y me hayáis apoyado. Gracias María, Andrea, Elena, Pablo H, Elvira, Kala, Ana y, especialmente, Pablo M, por tu ayuda con los CD, y por creer en mí más que yo misma. Y gracias a los demás, que aunque nos vemos menos, tenéis un huequito en mi vida, y siempre me aportáis un montón de cosas positivas, gracias a todos.

Ahora sí, gracias a mi familia, lo más importante que tengo. Me hacéis sentirme afortunada a diario. Gracias a mi madre, por todo, porque eres única, porque me apoyas en todo, porque me has transmitido tu espíritu de independencia y de trabajo, y por la educación que me has dado. Gracias a mis abuelos, Paco y Memi, mis grandes ejemplos, de amor eterno, de constancia y de sencillez. Gracias a mis padrinos y a todos mis tíos y primos, por hacerme sentir orgullosa de esta gran familia Pizarro.

Muchas gracias a todos, y a los que haya podido dejarme en el tintero.

ÍNDICE



1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. ASPECTOS GENERALES DE LAS NEOPLASIAS	7
2.2. LINFOMA EN EL PERRO: CLASIFICACIÓN ANATÓMICA	9
2.3. LINFOMA DIGESTIVO CANINO.....	12
2.3.1. ETIOLOGÍA.....	12
2.3.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	13
2.3.3 LOCALIZACIÓN Y ASPECTO MACROSCÓPICO	14
2.3.4 SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA	15
2.3.5 DIAGNÓSTICO	16
2.4. TOMA DE BIOPSIAS: ENDOSCOPIA DIGESTIVA vs. LAPAROTOMÍA	22
2.5. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS LINFOMAS APLICADA A LA ESPECIE CANINA	25
2.6. EL LINFOMA INTESTINAL EN MEDICINA HUMANA	32
2.6.1 LINFOMA T ASOCIADO A ENTEROPATÍA (EATL).....	33
2.7. EL LINFOMA INTESTINAL EN EL PERRO	35
2.8. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LINFOMA INTESTINAL E IBD EN PERRO Y GATO.	39
2.8.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO DIFERENCIAL DE LINFOMA INTESTINAL E IBD	39
2.8.2 DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DIFERENCIAL DE LINFOMA INTESTINAL E IBD.....	42
2.8.3 CLONALIDAD DE LINFOCITOS EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LINFOMA INTESTINAL E IBD.....	48
2.8.3.1 CLONALIDAD DE LINFOCITOS EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LINFOMA INTESTINAL E IBD EN LA ESPECIE FELINA.....	48
2.8.3.2 CLONALIDAD DE LINFOCITOS EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LINFOMA INTESTINAL E IBD EN LA ESPECIE CANINA	50
2.9. POBLACIONES LINFOCITARIAS	54
2.9.1 MARCADORES LINFOCITARIOS UTILIZADOS EN LOS LINFOMAS CANINOS Y FELINOS	57
2.10. LA PROLIFERACIÓN CELULAR: Ki-67	59
2.10.1. KI-67 EN MEDICINA HUMANA	60
2.10.2 KI-67 Y LAS NEOPLASIAS CANINAS	62
2.10.3 EXPRESIÓN DE KI-67 EN EL LINFOMA CANINO	63
2.11. PRONÓSTICO DEL IBD Y DEL LINFOMA CANINO	65
3. OBJETIVOS.....	67

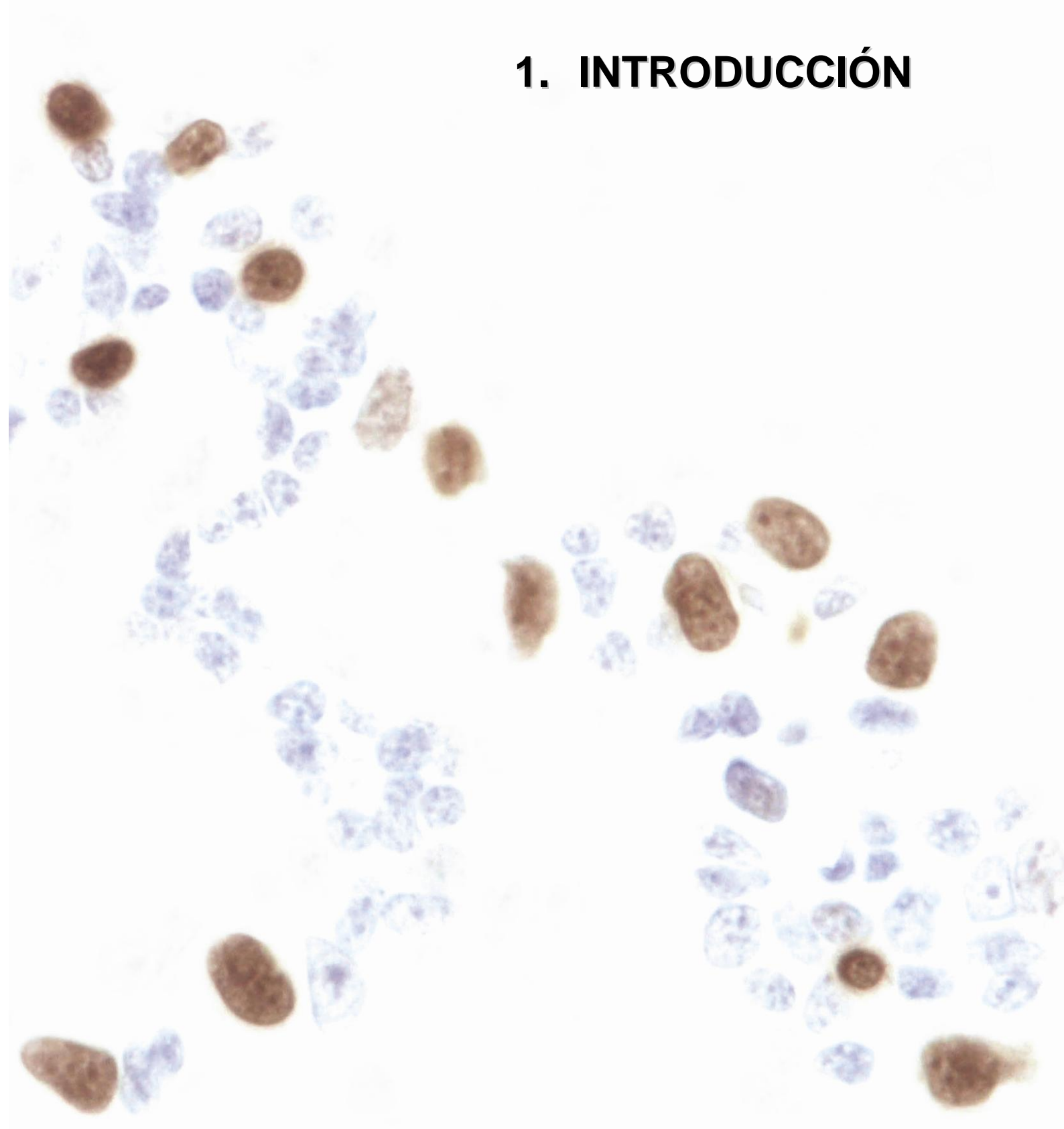
4. MATERIAL Y MÉTODOS	71
4.1. ANIMALES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	73
4.2. PROTOCOLO DIAGNÓSTICO	75
4.2.1 ANAMNESIS.....	75
4.2.2 EXPLORACIÓN FÍSICA	76
4.2.3 ÍNDICE DE ACTIVIDAD CLÍNICA	76
4.2.4 ANALÍTICA SANGUÍNEA	77
4.2.5 ANÁLISIS COPROLÓGICO SERIADO PARA LA DETECCIÓN DE PARÁSITOS	79
4.2.6 PRUEBAS DE MALDIGESTIÓN	79
4.2.7 ECOGRAFÍA ABDOMINAL	80
4.2.8 EXPLORACIÓN ENDOSCÓPICA	80
4.2.8.1 PREPARACIÓN PREVIA DE LOS ANIMALES	80
4.2.8.2 PROTOCOLO ANESTÉSICO	80
4.2.8.3 EXPLORACIÓN ENDOSCÓPICA	81
4.2.9 OBTENCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS	83
4.2.9.1 TOMA DE BIOPSIAS.....	83
4.2.9.2 PROCESADO DE LAS BIOPSIAS	83
4.3. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO	85
4.4. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	88
4.4.1 CONTROLES PARA EL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	88
4.4.2 TÉCNICA EMPLEADA PARA KI-67 Y CD3	89
4.4.3 TÉCNICA EMPLEADA PARA CD20	92
4.4.4 VALORACIÓN DE LA INMUNOTINCIÓN	94
4.4.4.1 VALORACIÓN DE KI-67	94
4.4.4.2 VALORACIÓN DE CD3 Y CD20	95
4.5. ESTUDIO DE LA CLONALIDAD DE LINFOCITOS T: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	96
4.5.1 DESPARAFINADO DE LAS MUESTRAS	97
4.5.2 EXTRACCIÓN DE ADN	98
4.5.3 PREPARACIÓN DE MASTERMIX (PREMEZCLA DE REACTIVOS).....	99
4.5.4 PROCESADO DE LAS MUESTRAS MEDIANTE PCR	99
4.5.5 LECTURA DE LA PCR	101
4.5.5.1 LECTURA AUTOMÁTICA EN QIAxCEL ADVANCED	101
4.5.5.2 LECTURA EN EL GEL DE ELECTROFORESIS	102
4.5.5.3. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	103

4.6.	ESTUDIO ESTADÍSTICO	104
5.	RESULTADOS	107
5.1.	ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO	109
5.1.1	DISTRIBUCIÓN RESPECTO A LA EDAD Y EL SEXO.....	109
5.1.2.	DISTRIBUCIÓN RESPECTO A LA RAZA Y EL PESO	110
5.2.	ESTUDIO CLÍNICO	112
5.2.1.	MOTIVOS DE CONSULTA.....	112
5.2.2.	SIGNOS CLÍNICOS	113
5.2.2.1	SIGNOS CLÍNICOS GENERALES	113
5.1.2.1	SIGNOS CLÍNICOS POR GRUPOS DE ESTUDIO E ÍNDICE DE ACTIVIDAD CLÍNICA	114
5.2.3	PALPACIÓN ABDOMINAL	116
5.2.4.	ANALÍTICA SANGUÍNEA	117
5.2.4.1	HEMOGRAMA.....	117
5.2.4.2	BIOQUÍMICA SANGUÍNEA	118
5.2.5	ECOGRAFÍA ABDOMINAL	118
5.3	ESTUDIO ENDOSCÓPICO	121
5.3.1	HALLAZGOS ENDOSCÓPICOS EN INTESTINO DELGADO EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	121
5.3.2	HALLAZGOS ENDOSCÓPICOS EN INTESTINO DELGADO POR GRUPOS DE ESTUDIO	123
5.4.	ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO	129
5.4.1	PARÁMETROS DE LA WSAVA.....	129
5.4.1.1	RELACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA WSAVA CON LOS HALLAZGOS CLÍNICOS Y ENDOSCÓPICOS	134
5.4.2	OTROS PARÁMETROS NO WSAVA EVALUABLES EN TODOS LOS CASOS.....	135
5.4.2.1	PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL INFILTRADO DE CÉLULAS REDONDAS	135
5.4.3.	PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL LINFOMA INTESTINAL.....	136
5.3.3.1.	MORFOLOGÍA E ÍNDICE MITÓTICO DE LOS LINFOMAS INTESTINALES	138
5.5.	ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	140
5.5.1.	EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES LINFOCITARIOS CD3 Y CD20	140
5.5.1.1.	CLASIFICACIÓN DE LAS LESIONES UTILIZANDO CD3 Y CD20	140
5.5.1.2.	INMUNOFENOTIPO DE LAS LESIONES	143
5.5.1.3	ESTUDIO DE LOS LINFOCITOS INTRAEPITELIALES TEÑIDOS CON CD3	146
5.5.2.	EXPRESIÓN DEL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR Ki-67	149
5.5.2.1	RELACIÓN DE KI-67 CON LOS PARÁMETROS CLÍNICOS Y ENDOSCÓPICOS	152
5.5.2.2	RELACIÓN DE KI-67 CON LOS PARÁMETROS HISTOPATOLÓGICOS	154

5.6	ESTUDIO DE LA CLONALIDAD DE LINFOCITOS T: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	157
5.6.1	RELACIÓN DE LA CLONALIDAD CON PARÁMETROS CLÍNICOS Y ENDOSCÓPICOS	160
5.6.2	RELACIÓN DE LA CLONALIDAD CON LOS ÍNDICES DE GRAVEDAD CLÍNICA, ENDOSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA	160
5.6.3.	RELACIÓN DE LA CLONALIDAD CON LOS PARÁMETROS HISTOPATOLÓGICOS Y CON Ki-67.	161
5.7.	TABLA RESUMEN DE LOS PASOS DIAGNÓSTICOS SEGUIDOS CON LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS Y DE PCR.....	163
6.	DISCUSIÓN.....	165
6.1.	ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO	167
6.1.1	DISTRIBUCIÓN RESPECTO A LA EDAD Y EL SEXO.....	167
6.1.2.	DISTRIBUCIÓN RESPECTO A LA RAZA Y EL PESO	168
6.2.	ESTUDIO CLÍNICO	170
6.2.1.	MOTIVO DE CONSULTA	170
6.2.2.	SIGNOS CLÍNICOS	171
6.2.3.	ÍNDICE DE ACTIVIDAD CLÍNICA	174
6.2.4.	PALPACIÓN ABDOMINAL	176
6.2.5.	ANÁLITICA SANGUÍNEA	177
6.2.6.	ECOGRAFÍA ABDOMINAL	178
6.3.	ESTUDIO ENDOSCÓPICO	181
6.3.1.	TOMA DE MUESTRAS	181
6.3.2	PARÁMETROS ENDOSCÓPICOS EN INTESTINO DELGADO.....	181
6.4.	ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO	186
6.4.1	PARÁMETROS DE LA WSAVA.....	187
6.4.2.	OTROS PARÁMETROS NO WSAVA EVALUABLES EN TODOS LOS CASOS.....	192
6.4.3	PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL LINFOMA INTESTINAL	194
6.4.4	MORFOLOGÍA E ÍNDICE MITÓTICO DE LOS LINFOMAS INTESTINALES	196
6.5.	ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	199
6.5.1.	EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES LINFOCITARIOS CD3 Y CD20	199
6.5.1.1.	CLASIFICACIÓN DE LAS LESIONES UTILIZANDO CD3 Y CD20	199
6.5.1.2.	INMUNOFENOTIPO DE LAS LESIONES	201
6.5.1.3.	ESTUDIO DE LOS LINFOCITOS INTRAEPITELIALES TEÑIDOS CON CD3	203
6.5.2	EXPRESIÓN DEL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR Ki-67.....	206
6.6.	ESTUDIO DE LA CLONALIDAD DE LINFOCITOS T: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	209

6.7. CONSIDERACIONES FINALES DESPUÉS DEL ESTUDIO EN CONJUNTO DE LOS RESULTADOS	214
6.8. PROPUESTA DE ALGORITMO PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE LINFOMA INTESTINAL E IBD EN BIOPSIAS ENDOSCÓPICAS CANINAS.....	218
7. CONCLUSIONES.....	217
8. RESUMEN.....	221
9. SUMMARY	225
10. BIBLIOGRAFÍA	229
11. PUBLICACIONES.....	249
11.1. ARTÍCULOS	251
11.2. APORTACIONES A CONGRESOS.....	275

1. INTRODUCCIÓN



Actualmente, la enfermedad crónica intestinal, más conocida por el acrónimo inglés de “*IBD*” (inflammatory bowel disease), se considera una de las causas más frecuentes de diarrea y vómito crónicos en el perro. Uno de los retos más importantes es su diferenciación, cuando se trata de un IBD grave, con el linfoma intestinal. Ambas enfermedades comparten sintomatología clínica, que incluye, fundamentalmente, vómito crónico, diarrea crónica, pérdida de peso y alteraciones del apetito. El protocolo diagnóstico es, por tanto, muy similar en ambas, de manera que la exploración física, y los hallazgos en ecografía, analítica sanguínea o endoscopia son de muy poca utilidad en su diferenciación. El diagnóstico de estas enfermedades implica, necesariamente, el estudio histopatológico de biopsias intestinales, cuya interpretación puede resultar muy compleja tanto para clínicos como para patólogos (Willard y col., 2002; Day y col., 2008; Willard y col., 2010). Sin embargo, el diagnóstico diferencial es crucial, ya que de él depende el tratamiento y pronóstico del animal. Los linfomas intestinales de tipo difuso, especialmente los linfomas T-intestinales, se acompañan, muy frecuentemente, de lesiones inflamatorias, de manera que podemos observar cambios inflamatorios superpuestos o adyacentes a las zonas neoplásicas; esto dificulta el diagnóstico, pudiendo llevar a un diagnóstico erróneo de IBD. Por otro lado, se han descrito cambios neoplásicos en células aisladas, aunque la imagen general sea la de una lesión benigna (Tams, 2003; Valli, 2007).

A todo esto se suma la difícil estandarización de los parámetros histológicos de ambas enfermedades, dando lugar a grandes inconsistencias en la interpretación de biopsias endoscópicas por diferentes patólogos experimentados (Willard y col., 2002; Willard y col., 2010). A este respecto, en los últimos años se han realizado diferentes estudios, tratando de consensuar una serie de parámetros para su uso a nivel internacional en la enfermedad inflamatoria crónica intestinal (Day y col., 2008; Washabau y col., 2010). Sin embargo, en la práctica, todavía queda mucho por investigar y aclarar en este campo. No debemos olvidar que, muchas veces, las diferencias entre ambas enfermedades son tan sutiles que han llevado a sugerir la posible evolución de IBD a linfoma intestinal (Hall y col., 2007; Dandrieux y col., 2008; Rodríguez-Franco y col., 2010; Gieger, 2011).

El desarrollo de las técnicas endoscópicas, mínimamente invasivas y con mínimas complicaciones para el paciente, está permitiendo un diagnóstico cada vez más precoz de estas patologías. Sin embargo, las biopsias tomadas mediante endoscopia constituyen una dificultad añadida en el diagnóstico diferencial entre linfoma intestinal e IBD grave. En primer lugar esta técnica no

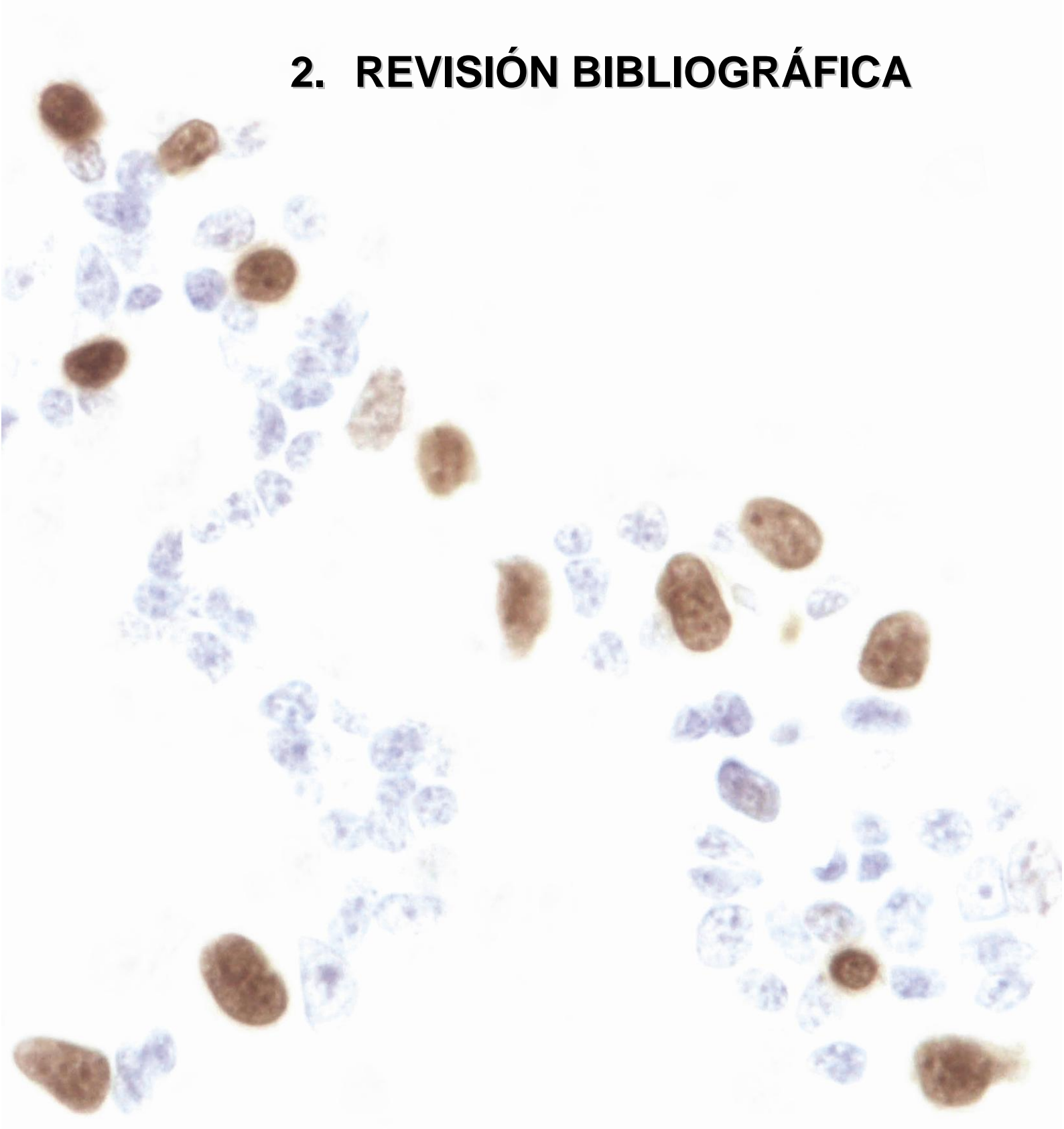
permite el acceso a tramos distales de intestino delgado, lo que puede suponer un problema, ya que hay autores que describen diferencias en el diagnóstico de unas regiones a otras, tanto en el perro como en el gato (Casamian-Sorrosal y col., 2010; Scott y col., 2011). Asimismo, la endoscopia, habitualmente, sólo permite obtener biopsias de la mucosa intestinal, de forma que el diagnóstico de linfomas localizados en zonas más profundas es muy complicado.

A lo largo del tiempo, se ha avanzado en la clasificación del linfoma intestinal, tanto en la especie canina como en felina, gracias a la utilización de marcadores linfocitarios, entre otros factores. Se ha tratado de adaptar la clasificación de los linfomas de la OMS (Organización Mundial de la Salud) para medicina humana a las especies canina y felina (Valli y col., 2002; Head y col., 2003). Esta clasificación ha sido utilizada en el linfoma multicéntrico canino (Vezzali y col., 2010; Ponce y col., 2010; Valli y col., 2011). Sin embargo, no hemos encontrado trabajos que establezcan una clasificación según el patrón morfológico de la OMS para el linfoma intestinal canino en concreto.

En el año 2003 Burnett y colaboradores describen la técnica de PCR a partir de ADN de tejidos, en la especie canina, para detectar clonalidad de linfocitos B y T, y proponen su aplicación en la diferenciación entre una proliferación benigna de linfocitos de tipo reactivo, y una proliferación neoplásica. Esta técnica también ha sido descrita en la especie felina (Moore y col., 2005), en la que se ha aplicado para la diferenciación entre IBD y linfoma intestinal (Moore y col., 2005; Kiupel y col., 2011), con resultados muy prometedores. En la especie canina se sugirió la aplicación de estos métodos en el diagnóstico del linfoma digestivo, especialmente para la diferenciación de un linfoma “latente” (Kaneko y col., 2008). Fukushima y colaboradores (2009) aplican esta técnica en 12 biopsias endoscópicas diagnosticadas histológicamente de linfoma.

Por todo esto, en este trabajo nos hemos planteado profundizar en el estudio y caracterización de estas dos enfermedades, así como establecer aspectos diferenciales en cuanto a sus características clínicas, endoscópicas e histopatológicas, y mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas y de PCR. Para la realización de las técnicas de PCR se va a emplear un sistema de electroforesis capilar de alta definición, con el que se pretende mejorar la sensibilidad de las mismas. Se va a realizar, además, una reclasificación de los linfomas intestinales caninos, adaptando las últimas clasificaciones de la OMS para medicina humana (Swerdlow y col., 2008; Campo y col., 2011).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



2.1 ASPECTOS GENERALES DE LAS NEOPLASIAS DIGESTIVAS EN EL PERRO

La especie canina es la que presenta un mayor número de neoplasias espontáneas, de los animales domésticos que se han estudiado a lo largo del tiempo, aunque no llegue a la incidencia que existe en el hombre (Head, 1976; Hayes y col., 1989; Brown y col., 2007). Son escasos y antiguos los estudios sobre la incidencia de tumores en la especie canina, con datos que varían de los 381 a los 1126 casos por cada 100.000 animales (Dorn y col., 1968; Mac Vean y col., 1978). Bronson describe, en 1982, el cáncer como la causa más frecuente de muerte en la especie canina, llegando a representar entre el 40 y el 50% de las muertes en perros mayores de 10 años.

Dentro del conjunto de tumores que podemos encontrar en la especie canina, las neoplasias del tracto digestivo tienen una baja incidencia de presentación. Se estima que alrededor de un 5-6% de las neoplasias caninas se localizan en el tracto digestivo; aunque aún así constituyen el tercer tipo de neoplasia más frecuente, después de los tumores de mama y las neoplasias cutáneas (Dorn y col., 1968; Guildford y col., 1996; Leibman y col., 2003; Merlo y col., 2008; Rodríguez-Franco y col., 2010). Samuel y colaboradores, en 1999, realizan un estudio en el Reino Unido, en el que encuentran que un 4,7% de las neoplasias caninas se localizan en el aparato digestivo, excluyendo la zona oral y faríngea, lo que supone un porcentaje mayor que el indicado por los autores anteriores.

La mayor parte de neoplasias digestivas, alrededor de un 70%, se localizan en la cavidad oral. Después de la cavidad oral, el intestino grueso es el más frecuentemente afectado por este tipo de patología, con un porcentaje alrededor del 20%. Los tumores de estómago son poco comunes (10%), y aún más raros los de intestino delgado y los de esófago, para los que no existen datos publicados referentes a la incidencia real de presentación (Guildford y col., 1996; Leibman y col., 2003; Merlo y col., 2008; Gamlem y col., 2008; Rodríguez-Franco y col., 2010).

Entre las neoplasias que afectan al intestino delgado, en el perro la más frecuente es el adenocarcinoma, seguido del linfoma o linfosarcoma intestinal,

que es la más frecuente en el gato. Podemos encontrar además, en esta localización, leiomiomas y hemangiosarcomas con relativa frecuencia, y otros tumores descritos con una frecuencia muy baja como mastocitomas, plasmocitomas, carcinoides, fibrosarcomas, sarcomas anaplásicos o tumores estromales. Entre los tumores benignos, menos frecuentes que los malignos en esta localización, el más común es el adenoma, y también se han descrito leiomiomas y fibromas (Head, 1976; Patnaik y col., 1977; Crow, 1985; van der Gaag y col., 1990; Guildford y col., 1996; Cohen y col., 2003; Head y col., 2003; Sako y col., 2003; Frost y col., 2003).

2.2 LINFOMA EN EL PERRO: CLASIFICACIÓN ANATÓMICA

El linfoma es una de las neoplasias malignas más frecuentes en la especie canina. Se define como una proliferación de células linfoides malignas, que afecta principalmente a los ganglios linfáticos, y a órganos parenquimatosos, como el hígado y el bazo (Vail y col., 2007). Puede clasificarse según la localización anatómica del tumor primario en cuatro tipos principales: multicéntrico, mediastínico, digestivo y extranodal (renal, nasal, cutáneo, espinal, ocular) (Jacobs y col., 2002; Vonderhaar y col., 1998; Vail y col., 2007)

- Linfoma multicéntrico (o generalizado): se caracteriza por la afectación de múltiples ganglios linfáticos, con o sin afectación de hígado o bazo. Los perros afectados presentan linfadenomegalia de uno o más ganglios linfáticos. Además, es frecuente la afectación de hígado, bazo o médula ósea, presentándose hepato o esplenomegalia que provocan distensión abdominal. La sintomatología es inespecífica e incluye fiebre, anorexia, letargia, vómitos y pérdida de peso (Vonderhaar y col., 1998; MacEwen y col., 1996).
- Linfoma mediastínico: afecta a los ganglios linfáticos mediastínicos craneales y caudales, además de al timo. Por ello, en ocasiones se denominan linfomas tímicos. Los síntomas más frecuentes asociados a este tipo de neoplasia son disnea, tos, intolerancia al ejercicio, disfagia y anorexia. Además, es frecuente la aparición de derrames pleurales y/o mediastínicos (Olgivie y col., 1995; Vonderhaar y col., 1998; Vail y col., 2007).
- Linfoma extranodal, solitario o regional (renal, nasal, cutáneo, espinal y ocular): dependiendo de la afectación de un determinado órgano o sistema aparece una sintomatología específica asociada, además de una sintomatología inespecífica (anorexia, letargia, pérdida de peso...). Puede afectar, además, a los ganglios linfáticos regionales.
El linfoma cutáneo puede ser focal o generalizado, con la aparición de nódulos, placas, úlceras, eritroderma o dermatitis exfoliativa, muchas veces con la aparición de prurito. Esta forma suele clasificarse en

epiteliotrópica (normalmente de células T) y no epiteliotrópica (normalmente de células B).

El linfoma, en el sistema nervioso, puede afectar tanto al sistema nervioso central como al periférico, aunque es más frecuente en el primero, con la aparición de ataques y otros síntomas neurológicos. Puede aparecer de forma primaria o como consecuencia de un linfoma multicéntrico. En el caso del linfoma espinal, que puede aparecer en el espacio epidural, en el espacio subdural, o en el parénquima medular, el perro puede presentar hemi o tetraparesia o hemi o tetraplejía, si existe compresión de la médula espinal a causa del tumor.

El linfoma ocular puede ser primario o secundario, e incluye signos oftalmológicos como uveítis bilateral anterior, engrosamiento del iris, queratitis intersticial, hiperemia, hipopion, sinequia posterior, glaucoma, desprendimiento de retina, o infiltración de nervio óptico.

El linfoma nasal o de senos paranasales suele dar una sintomatología clínica de disnea, descarga nasal, alteraciones morfológicas faciales y anorexia.

El linfoma renal puede aparecer como tumor primario, o asociado a las formas multicéntrica o digestiva. La sintomatología es inespecífica (anorexia, letargia, vómitos), y en ocasiones se presenta insuficiencia renal. La palpación abdominal puede revelar renomegalia uni o bilateral, y en el perfil bioquímico podemos detectar azotemia o hiperfosfatemia (Vanderhaar y col., 1998; Vail y col., 2007).

- Linfoma alimentario o digestivo: afecta al tracto digestivo, en forma de masas únicas o múltiples, o como una infiltración gastrointestinal difusa. Puede existir o no afectación de los ganglios linfáticos mesentéricos, el hígado o el bazo. La sintomatología más frecuente es una sintomatología digestiva de tipo crónico (Vonderhaar y col., 1998; Guilford y col., 1996; Leibman y col., 2003). A partir de este punto vamos a dedicar el presente trabajo fundamentalmente a este tipo de linfoma.

La forma más frecuente en el perro es el linfoma multicéntrico, que representa más del 84% de los linfomas; seguido por el linfoma alimentario, que es el segundo más frecuente, ya que constituye más del 7% de los linfomas caninos. El linfoma cutáneo representa alrededor del 6% de los linfomas de la

especie canina, y el mediastínico sobre el 3%. El linfoma extranodal es el menos frecuente (Moore y col., 2000; Vail, 2007; Gieger., 2011).

2.3 LINFOMA DIGESTIVO CANINO

El linfoma digestivo primario es el más frecuente en el tracto gastrointestinal canino, aunque éste también puede estar afectado por el linfoma multicéntrico con afectación digestiva (Gieger, 2011). Así, Couto y colaboradores, en 1989, describen 15 perros con linfoma digestivo primario, frente a 5 con linfoma multicéntrico con afectación gastrointestinal. Rassnick y colaboradores, en 2009, publican resultados similares, describiendo 13 perros con un linfoma gastrointestinal primario, frente a 5 con un linfoma multicéntrico con afectación digestiva.

2.3.1. ETIOLOGÍA

La etiología del linfoma canino es desconocida. Se barajan una serie de factores predisponentes. Entre ellos encontramos factores genéticos, ya que se ha observado una agrupación ocasional de linfomas en perros emparentados, y una caracterización genotípica de perros con linfoma ha revelado que el 25% de ellos presentan trisomía en el cromosoma 13 como anomalía cromosómica primaria, lo que se asoció con un mejor pronóstico (Teske y col., 1994; Hahn y col., 1994; Valli, 2007). Otros factores incluyen la exposición a ciertos herbicidas, como los que contienen ácido 2,4-diclorofenoxiacético; campos magnéticos de baja frecuencia y alta intensidad; la residencia en áreas industriales; o mutaciones en el gen supresor de tumores p53, factores que han sido asociados con diversas neoplasias en la especie humana (Vonderhaar, 1998; Vail y col., 2007; Reif, 1995; Hayes y col., 1995; Kaneene y col., 1999; Jacobs y col., 2002).

Se ha estudiado la actividad de retrovirus, identificados en cultivos celulares de linfoma canino, y su posible participación en la etiología de estas neoplasias. Sin embargo, se han identificado tanto en tejido linfoide neoplásico como sano, de modo que no existen datos que demuestren que desempeñan un rol en la etiología del linfoma en la especie canina (Madewell y col., 1985; Safran y col., 1992).

En el caso del linfoma digestivo o alimentario, se ha observado de manera frecuente que el linfoma intestinal canino estaba acompañado o precedido por

una enteritis crónica linfoplasmocitaria de carácter grave (IBD), lo que sugiere una posible evolución de una a otra enfermedad, que no ha sido demostrada (Hall y col., 2007; Dandrieux y col., 2008; Rodríguez-Franco y col., 2010; Washabau y col., 2010; Gieger, 2011). Esto ha sido observado también en el gato (Moore y col., 2005; Moore y col., 2012). En medicina humana, un tipo de linfoma de tipo T intestinal, el linfoma T asociado a enteropatía de tipo I, está con mucha frecuencia relacionado con la presentación de enfermedad celíaca (Swerdlow y col., 2008). Además, una de las complicaciones a largo plazo más temidas y controladas en medicina humana, tanto en la colitis ulcerosa como en la enfermedad de Crohn que afecta a colon (las dos presentaciones del IBD en medicina humana), es el desarrollo de un proceso neoplásico. Estos procesos neoplásicos asociados, en el caso de la enfermedad de Crohn comienzan como una displasia de la mucosa, que puede desarrollarse hacia un carcinoma (Turner, 2010; Claessen y col., 2011). El IBD humano se ha relacionado con un aumento del riesgo de padecimiento de enfermedades linfoproliferativas (Claessen y col., 2011), aunque estudios de población no han confirmado esta hipótesis (Lewis y col., 2001; Askling y col., 2005).

2.3.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

El linfoma digestivo afecta principalmente a perros de mediana a avanzada edad, aunque la edad media es algo más baja que en otros tumores intestinales. El rango de edad es muy variable, encontrándose la mayoría de los casos publicados entre 1,5 y 15 años, con una media alrededor de los 10 años, aunque existen publicaciones de casos de linfoma intestinal en perros jóvenes (Lowe y col., 2004; Kodama y col., 2009). En uno de los estudios más amplios del linfoma digestivo canino, Coyle y colaboradores, en 2004, describen una media de edad de 7,7 años, con un rango que oscila entre los 1,5 a los 14,7 años. Frank y colaboradores (2007) encuentran una media de edad de 8,2 años, con un rango de 3,2 a 13,2 años. Para Rassnick y colaboradores (2009) la media es de 10 años, con un rango entre los 3 y los 15 años, similar al estudio de Ozaki y colaboradores (2006). Fukushima y colaboradores (2009) describen una media de 9 años, y un rango de 4 a 13 años.

Si bien diversas neoplasias gastrointestinales son claramente más frecuentes en perros machos que en hembras, no está clara esta predisposición sexual en el linfoma digestivo. Se han publicado varios trabajos en los que esta

neoplasia es más frecuente en machos que hembras, con ratios de 19:11 (Frank y col., 2007), 10:8 (Rassnick y col., 2009), o 7:4 (Ozaki y col., 2006) pero sin llegar a ser esta diferencia significativa. Coyle y colaboradores (2004), sin embargo, encuentran un 52% de hembras en su estudio de 44 casos clínicos de linfoma gastrointestinal.

Tampoco existe una predisposición racial clara al padecimiento del linfoma canino; aunque se ha sugerido una mayor incidencia de presentación de linfomas, sin hacer diferenciación anatómica, en ciertas razas como Bóxer, Sharpei, Setter, Cocker Spaniel, Scottish Terrier y Pastor Alemán (Vail y col., 2007; Pastor y col., 2009; Fukushima y col., 2009). Un estudio realizado en 608 casos de linfoma (incluyendo varias presentaciones anatómicas) diagnosticados en Francia durante un año, reveló que las razas Bóxer, Setter y Cocker Spaniel presentaban una prevalencia mayor. Encontraron, además, una asociación de la raza Bóxer y el linfoma tipo T y las razas Pastor Alemán y Rottweiler y el linfoma tipo B (Pastor y col., 2009). Sözmen y colaboradores (2005) también encuentran una predilección racial aparente para la raza Bóxer.

En cuanto al linfoma digestivo, un trabajo realizado en 44 perros encuentra que esta neoplasia aparece con mayor frecuencia en las razas Bóxer y Sharpei, seguidas del Pastor Alemán, el Doberman Pinscher y el Labrador Retriever (Coyle y col., 2004). En el trabajo de Frank y colaboradores en 2007, al igual que en el de Rassnick y colaboradores en 2009, la raza más representada fue el Golden Retriever (Frank y col., 2007; Rassnick y col., 2009).

2.3.3 LOCALIZACIÓN Y ASPECTO MACROSCÓPICO

La localización más común del linfoma digestivo en el perro es el intestino delgado, seguido del estómago (puede presentarse en cualquier zona, aunque es más frecuente en antro pilórico) y el hígado (Rassnick y col., 2009; Coyle y col., 2004). Frank y colaboradores (2007) realizan un estudio retrospectivo a lo largo de nueve años, en el que incluyen 30 casos de linfoma gastrointestinal. La localización más frecuente fue también el intestino delgado (n = 13), seguido del estómago e intestino grueso (n = 5 en ambos), y con dos o más sitios afectados en los restantes siete casos. Sin embargo, se desconoce, dentro de intestino delgado, cuál es el tramo más frecuentemente afectado por este tipo de tumor, ya que no existen estudios al respecto. En el gato, hay estudios que describen como localización más frecuente el yeyuno, especialmente para el linfoma T,

aunque es frecuente que el proceso se extienda a varios segmentos intestinales. En el caso del linfoma B, es más frecuente en el estómago o en la unión ileo-ceco-cólica (Moore y col., 2012).

El linfoma digestivo puede presentarse en forma de masa aislada, varias masas, o bien de forma difusa en el tracto gastrointestinal, en cualquier localización de éste (Guildford y col., 1996; Vail y col., 2007). La forma más común de los linfomas en el perro suele ser diseminada y de alto grado de malignidad (Valli, 2007), o en forma de masas pero con un engrosamiento generalizado de la pared intestinal y una disminución de la luz intestinal (Pastor y col., 2009). Se ha observado ulceración en la mucosa hasta en la mitad de los casos de linfoma intestinal (Valli, 2007). Puede o no aparecer afectación de los ganglios linfáticos mesentéricos, así como de hígado, bazo o riñón (Guildford y col., 1996; Vonderhaar y col., 1998).

2.3.4 SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA

Los signos clínicos más frecuentes en los perros con linfoma digestivo varían desde síntomas inespecíficos como anorexia o letargia, hasta signos digestivos más graves que incluyen pérdida de peso, vómitos, diarrea, y melena (Couto y col., 1989; Tams, 2003; Miura y col., 2004; Ozaki y col., 2006; Frank y col., 2007; Hall y col., 2007). Cuando se encuentran afectados tramos de intestino grueso puede aparecer también tenesmo y disquecia. En la exploración física es común encontrar engrosamiento de las asas intestinales, linfadenopatías mesentéricas o dolor a la palpación abdominal, o mucosas pálidas.

Generalmente, se trata de síntomas crónicos, que responden mal a tratamiento sintomático (Leibman y col., 2003). Frank y colaboradores (2007) describen el vómito crónico como síntoma más frecuente, seguido de diarrea, anorexia, y pérdida de peso y letargia, que ambas comparten frecuencia, similar a lo que describen otros autores (Rassnick y col., 2009). En el estudio de Miura y colaboradores (2004), el signo clínico más frecuente es, sin embargo, la pérdida de peso, seguida de diarrea, y después por vómitos y anorexia, ambas con la misma frecuencia, aunque las diferencias en los diferentes signos clínicos son pequeñas.

En la analítica sanguínea podemos encontrar anemia, debida generalmente a un sangrado digestivo, y/o leucocitosis con neutrofilia, que suele asociarse a lesiones erosivas o ulcerativas intestinales, o a un sobrecrecimiento bacteriano secundario. Además, en la bioquímica sanguínea puede aparecer hipoproteinemia, debido a una enteropatía perdedora de proteínas, con cocientes de albúmina/globulina cercanos a 1 (Leibman y col., 2003). Frank y colaboradores (2007) describen la presencia de hipoproteinemia en 20 de 30 casos, de anemia en 11, y de leucocitosis en 13. Sin embargo, hay autores que no encuentran anemia en los linfomas digestivos que estudian, aunque el porcentaje de leucocitosis con neutrofilia es muy similar al del trabajo de Frank y colaboradores (Miura y col., 2004). Rassnick y colaboradores (2009) describen la presencia de hipoproteinemia (hipoalbuminemia) en el 61% de los casos, resultados similares a los obtenidos por Frank y colaboradores en 2007, y que contrastan con los hallados por Miura y colaboradores (2004), en los que se reduce al 42,9%.

Además de estos síntomas y hallazgos laboratoriales, pueden aparecer otros signos en las pruebas diagnósticas que se realicen, que se tratarán más pormenorizadamente en el siguiente apartado.

2.3.5 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico del linfoma intestinal se basa en el estudio histopatológico de biopsias intestinales. Antes de realizar la toma de biopsias debe seguirse un protocolo diagnóstico que es muy similar al que se utiliza para la enfermedad inflamatoria crónica intestinal.

En primer lugar, hay diferentes patologías que pueden cursar con unos signos clínicos iniciales similares a los que se observan en el linfoma alimentario canino. Por ello, es esencial realizar un protocolo diagnóstico completo y sistemático para descartar una serie de patologías (Guilford y col., 1996; Tams, 2003; Hall y col., 2007).

Entre estas patologías nos encontramos los errores dietéticos (ingesta de huesos, hierba, cualquier tipo de comida inadecuada, etc). Las causas dietéticas se descartan mediante una anamnesis rigurosa a los propietarios. Algunas enfermedades sistémicas, como la insuficiencia renal crónica, el

hiperadrenocorticismo o el hipotiroidismo pueden dar lugar a sintomatología digestiva crónica. Para descartarlas, se debe realizar una exploración física completa de los animales, una analítica sanguínea, y, en caso necesario, un análisis de orina. Las enfermedades producidas por protozoos, cestodos o nematodos producen también signos digestivos crónicos que pueden ser similares a los que aparecen en el linfoma digestivo canino. Para descartarlas se debe realizar un análisis coprológico seriado de tres días consecutivos en busca de parásitos. El análisis parasitológico de heces suele dar negativo en el linfoma digestivo canino. La insuficiencia pancreática exocrina debe descartarse en casos de diarrea crónica y pérdida de peso. La raza o la edad de los animales son datos de utilidad en este caso, pero para el diagnóstico se requiere la realización de pruebas que valoren la funcionalidad del páncreas exocrino, como la quimotripsina fecal en heces (prueba orientativa), o la T.L.I (trypsin-like immunoreactivity) en sangre, que es una prueba diagnóstica complementaria que da una mayor información sobre el padecimiento o no de insuficiencia pancreática exocrina.

Para el diagnóstico de un linfoma digestivo se debe comenzar por una anamnesis completa para detectar presencia de vómito crónico, pérdida de peso, diarrea crónica, anorexia, etc. Se realizarán una serie de preguntas específicas en los casos de diarrea crónica para identificar el tramo intestinal afectado (Tams, 2003; Hall y col., 2007).

Se debe seguir con una exploración física general que incluya palpación abdominal y palpación rectal. En las mucosas puede en ocasiones detectarse palidez indicadora de anemia, o pruebas de insuficiencias orgánicas importantes como pueden ser ictericia o úlceras urémicas en la mucosa oral. Se puede, además, valorar el grado de delgadez del animal (Tams, 2003; Hall y col., 2007).

La palpación abdominal es importante, ya que puede revelar organomegalias, engrosamientos de la pared de las asas intestinales o linfadenopatías mesentéricas, que deben confirmarse después mediante diagnóstico por imagen. También permite la detección de dolor abdominal (German, 2005; Hall y col., 2007). Algunos autores recomiendan, incluso, repetir la palpación abdominal previo a la exploración endoscópica, ya que al estar el animal bajo anestesia general se puede obtener información adicional que pueda pasar desapercibida con el animal despierto (Tams, 2003). Existen pocas citas bibliográficas que hagan referencia a estos datos en los linfomas gastrointestinales caninos. Así, algunos autores describen la presencia de dolor

a la palpación abdominal en 5 de 30 casos, y de mucosas pálidas en 7 de 30 casos de linfoma gastrointestinal. (Frank y col., 2007).

Es necesaria, después, la realización de un análisis de sangre que incluya un hemograma completo y una bioquímica sanguínea, para descartar enfermedades sistémicas que cursen con síntomas similares al linfoma digestivo y puedan descartarse de esta manera, como pueden ser una insuficiencia renal crónica, hipotiroidismo, etc. Se pueden observar alteraciones hematológicas tanto en el linfoma digestivo como en la enfermedad inflamatoria crónica intestinal (Tams, 2003; German, 2005; Hall y col., 2007).

Entre las alteraciones más frecuentes en el hemograma en los pacientes con linfoma gastrointestinal está la presencia de anemia, normocítica, normocrómica regenerativa, reflejo de las úlceras digestivas y la pérdida de sangre con las heces (Tams, 2003; German, 2005; Hall y col., 2007; Vail y col., 2007; Miller y col., 2009). La presencia de anemia, en el linfoma multicéntrico, afecta al 30-50 % de los casos (Madewell y col., 1986; Abbo y col., 2007; Gavazza y col., 2008). En el caso del linfoma intestinal, encontramos porcentajes similares, del 37% en el estudio de Frank y colaboradores (Frank y col., 2007), aunque Miura y colaboradores no encuentran ningún caso de anemia entre los siete linfomas gastrointestinales que estudian (Miura y col., 2004). También se han descrito, en algunos casos, variaciones en el recuento leucocitario, presentándose tanto leucocitosis como leucopenia en casos de linfoma multicéntrico (Teske y col., 1994). La existencia de leucocitosis con neutrofilia es relativamente frecuente, por un sobrecrecimiento bacteriano secundario a la enfermedad intestinal (Tams, 2003). En el linfoma gastrointestinal la mayoría de autores coinciden en que la leucocitosis con neutrofilia aparece en torno al 40% de los casos (Miura y col., 2004; Frank y col., 2007).

Es frecuente también la presencia de hipoproteinemia. Se trata de una panhipoproteinemia, con cociente albúmina/globulina en torno a 1, a causa de una enteropatía perdedora de proteínas. En el linfoma alimentario canino se considera la alteración bioquímica más frecuente, apareciendo el 61-80% de los casos (Fran, y col., 2007; Rassnick y col., 2009; Gieger, 2011), aunque hay estudios con porcentajes algo más bajos (Miura y col., 2004).

En el caso del linfoma digestivo, las alteraciones en la bioquímica sérica pueden ser, muchas veces, reflejo de la localización anatómica del tumor. Puede aparecer aumento de las enzimas específicas del hígado o la bilirrubina cuando

existe afectación de éste; así como elevación de urea y creatinina sérica debida a la infiltración renal del tumor, nefrosis hipercalcémica, o a deshidratación (Vail y col., 2007). La hipercalcemia, como parte del síndrome paraneoplásico, se ha asociado frecuentemente al linfoma canino, describiéndose entre el 10 y el 20% de los perros con linfoma multicéntrico y en hasta el 40% de los perros con linfoma mediastínico; sin embargo, no es común en el linfoma digestivo (Madewell y col., 1985; Olgivie y col., 1995; McEwen y col., 1996; Vonderhaar y col., 1998; Vail y col., 2007; Gieger, 2011).

En cuanto al diagnóstico por imagen, la radiología no ofrece muchos datos específicos para esta enfermedad. Se utiliza preferentemente para descartar otras alteraciones, más que para diagnosticar esta patología en concreto. Incluso se considera que la interpretación radiológica debe hacerse con cautela, por la posibilidad de que se consideren hallazgos positivos falsos (Leibman y col., 2003). En el linfoma alimentario, cuando aparece de forma infiltrativa y difusa, podemos encontrar un patrón de densidad gas/líquido anormal, con o sin dilatación intestinal, aunque en muchos casos la radiografía no mostrará hallazgos significativos (Riedesel, 2007). Es importante señalar que la radiografía simple no permite valorar adecuadamente el grosor de la pared del intestino, dado que es posible confundir un falso engrosamiento de la pared con una pared normal con contenido líquido o moco en la luz intestinal (García y col., 2010).

La ecografía abdominal es más adecuada para la valoración de esta enfermedad. Es importante para orientar el diagnóstico, y también para determinar la extensión del proceso, ya que pueden revelar la afectación de ganglios mesentéricos y sublumbares, así como del bazo y del hígado (Bradley, 2009; Gaschen y col., 2011).

En la evaluación ecográfica del tracto digestivo se deben valorar los siguientes parámetros: el engrosamiento de la pared intestinal, la posible pérdida de diferenciación de capas, la ecogenicidad de las capas, la motilidad intestinal, la ecogenicidad peri-intestinal y la presencia de líquido libre, la presencia de linfadenopatías regionales y la distribución de la enfermedad en focal, multifocal y difusa (Gaschen y col., 2011).

Existen trabajos que valoran el grosor normal de la pared intestinal de perros y gatos, que nos pueden servir como comparación. En el caso de la especie canina, en el segmento que corresponde a duodeno el grosor de la

pared es menor o igual a 6mm en perros de raza grande (>30kg), menor o igual a 5,3mm en perros de 20-30kg, y menor o igual a 5,1mm en perros de menos de 20kg de peso (Newell y col., 1999; Goggin y col., 2000; Delaney y col., 2003; Konde y col., 2003; Díez, 2010).

En el linfoma alimentario, los cambios pueden ser difusos, como suele ocurrir en el IBD, o bien puede aparecer como una masa solitaria, hipoecogénica y con una pérdida de diferenciación de capas, tanto en el perro como en el gato (Penninck y col., 1998). Se considera que el linfoma es la causa neoplásica más común de infiltración difusa de la pared intestinal con una apariencia muy similar a la que se observa en la enfermedad inflamatoria crónica intestinal. Es frecuente, también, la aparición de linfadenopatías regionales, con unos ganglios linfáticos redondeados, hipoecogénicos y aumentados de tamaño (Bradley, 2009; Gaschen y col., 2011).

Los hallazgos ecográficos pueden, más que diagnosticar la enfermedad, confirmar la necesidad de un estudio histopatológico mediante la toma de biopsias de las zonas afectadas. La endoscopia digestiva o bien la realización de una laparotomía exploratoria suelen ser los métodos más eficaces de obtención de biopsias para el diagnóstico del linfoma intestinal. La ecografía abdominal puede confirmar que la localización de las lesiones se encuentra en una zona al alcance de una exploración endoscópica (Rodríguez-Franco y col., 2010; Washabau y col., 2010).

El aspecto endoscópico de las lesiones en un linfoma digestivo puede ser en forma de masa o, más frecuentemente, de forma difusa, afectando a grandes porciones del intestino delgado, con la apariencia de una mucosa más o menos irregular, incluso de aspecto adoquinado, que puede recordar, en muchos casos, a las lesiones presentes en la enfermedad inflamatoria crónica intestinal (Roth y col., 1990; Miura y col., 2004; Tams, 2003). Existen trabajos que describen que el grado de alteraciones macroscópicas no se corresponden con el grado de lesiones histopatológicas (Roth y col., 1990), por lo que se debe tomar con cautela la imagen endoscópica, hasta que no se cuente con los resultados de la anatomía patológica. No existen muchos estudios disponibles que evalúen la imagen endoscópica del linfoma intestinal.

Como se ha comentado, para el diagnóstico, tanto del linfoma intestinal como del IBD, es necesario el estudio histopatológico de biopsias que sean adecuadas y representativas. Éstas pueden obtenerse mediante endoscopia

digestiva superior, o utilizando otras técnicas, que se tratan en el siguiente apartado.

2.4 TOMA DE BIOPSIAS: ENDOSCOPIA DIGESTIVA vs. LAPAROTOMÍA

En general, para el diagnóstico de cualquier neoplasia es necesario tomar muestras que sean adecuadas, representativas y que estén correctamente conservadas. Existen varias técnicas para la toma de muestras: biopsia (obtenida mediante endoscopia o laparotomía), o citología (Stricker y col., 2010). La técnica de aspiración con aguja fina guiada por ecografía se utiliza, en el caso del linfoma, para obtener muestras de ganglios linfáticos, o en grandes masas palpables o fácilmente accesibles, ya que supone un método más rápido y poco invasivo, que entraña mínimos riesgos para el paciente (Bonfanti y col., 2004). Existen diferentes puntos de vista en cuanto a la exactitud del diagnóstico citológico de neoplasia (Frank y col., 2007). En un estudio realizado en tumores gastrointestinales, el diagnóstico citológico fue consistente con el diagnóstico histológico de biopsias posteriores en sólo el 72% de los casos (Bonfanti y col., 2006). Sin embargo, hay autores que proponen la citología, incluyendo técnicas inmunohistoquímicas, como técnica de elección en el diagnóstico del linfoma canino (Sapierzynski y col., 2010). En general, aunque es preferible realizar histología para observar la morfología celular y clasificar las lesiones, la citología se define como una técnica aceptable de diagnóstico en el caso del linfoma multicéntrico (Vail, 2001).

En el linfoma intestinal la técnica de aspiración con aguja fina guiada por ecografía no tiene buenos resultados, siendo la técnica de biopsia de mayor valor diagnóstico. La toma de biopsias en el linfoma intestinal se puede realizar, fundamentalmente, por dos métodos: por laparotomía y mediante endoscopia digestiva.

La laparotomía permite la obtención de biopsias de tipo transmural, que incluyen todas las capas de la pared intestinal, desde la mucosa hasta la serosa, favoreciendo una evaluación exhaustiva por parte de los patólogos. Además, permite la obtención de biopsias de ganglios mesentéricos, así como de otros órganos como el hígado o el páncreas, en caso necesario. Sin embargo, la cirugía requiere un tiempo de anestesia mayor que la endoscopia, y es un proceso mucho más invasivo, que requiere mayores períodos de recuperación,

que pueden ser peligrosos en animales debilitados por su enfermedad (Tams, 2003).

La endoscopia digestiva, por el contrario, es un método mínimamente invasivo para la detección de masas en la luz del estómago, intestino delgado proximal, colon y recto, así como para la toma de biopsias. Permite una toma de biopsias con mínimas alteraciones para el paciente, minimizando el riesgo de perforación y peritonitis sépticas, comparado con la cirugía. Además, es un procedimiento rápido, con un período corto de anestesia y una rápida recuperación, conllevando incluso un menor coste económico para el propietario que la cirugía (Washabau y col., 2010). Es también una buena alternativa para la obtención de biopsias en casos de enteropatías con pérdida de proteínas, en los que las zonas de obtención de biopsias excisionales podrían tardar cierto tiempo en cicatrizar, teniendo en cuenta que dos de las causas más frecuentes de esta circunstancia son el linfoma intestinal y el IBD (Tams, 2003).

La endoscopia digestiva permite la visualización de la mucosa intestinal, de forma que se pueden elegir los sitios en los que tomar las biopsias, así como tomar múltiples biopsias de diferentes localizaciones, incrementando la detección de enfermedades con una distribución multifocal. Esta técnica requiere que el endoscopista tenga experiencia (Tams, 2003; Willard, 2010; Washabau y col., 2010). Willard y colaboradores, en 2008, describen las muestras endoscópicas de duodeno de tipo “superficial”, como las que presentan por lo menos una vellosidad con su lámina propia subyacente; “inadecuadas” las que presentan menos, mientras que consideran “adecuadas” las biopsias que incluyen tres vellosidades y se extienden hasta la muscular de la mucosa (Willard y col., 2008).

Es importante que el procesamiento de las muestras se realice de forma adecuada y cuidadosa y, sobre todo, que la orientación de las muestras permita la correcta evaluación de las mismas, para lo que es necesario un técnico cualificado, ya que si no se corre el riesgo de observar sólo el ápice de las vellosidades y no ver suficiente lámina propia como para poder emitir un diagnóstico. Incluso, la variabilidad en las tinciones con hematoxilina y eosina, puede dificultar la identificación de células como eosinófilos y neutrófilos (Willard, 2010).

Sin embargo, la endoscopia también presenta ciertas limitaciones. Como ya se ha mencionado, en cuanto a la profundidad de las biopsias, ya que mediante este método sólo es posible alcanzar la lámina propia, y existen

linfomas localizados en zonas profundas. Por otro lado, se pueden obtener muestras de estómago, duodeno, íleon y colon, pero no de yeyuno (Willard, 2010). A este respecto, es importante señalar las diferencias en el diagnóstico que aparecen de unas regiones a otras, como ponen de manifiesto Casamian-Sorrosal y colaboradores, en su trabajo en biopsias de íleon y duodeno (tanto endoscópicas como quirúrgicas) en la especie canina, encontrando que sólo el 27% de los 30 casos incluidos en el estudio presentan el mismo diagnóstico histopatológico en ambas localizaciones (Casamian-Sorrosal y col., 2010). Estas diferencias se han demostrado recientemente también en la especie felina (Scott y col., 2011).

Las limitaciones en el diagnóstico de biopsias endoscópicas frente a biopsias obtenidas por laparotomía se han puesto de manifiesto en la especie felina. En un estudio en 22 gatos de los que se tomaron biopsias endoscópicas previas a la toma de biopsias por laparotomía, cuatro de los casos se diagnosticaron erróneamente de IBD con el estudio de las biopsias endoscópicas, cuando la biopsia excisional evidenció un linfoma intestinal (Evans y col., 2006). Otros estudios ponen de manifiesto las dificultades en el diagnóstico de biopsias endoscópicas en esta especie (Barrs y col., 2012; Moore y col., 2012).

En la especie canina, Kleinschmidt y colaboradores, señalan que las biopsias quirúrgicas o transmurales de estómago e intestino son de gran ayuda en el diagnóstico de perros con síntomas gastrointestinales crónicos, especialmente en los casos de linfoma intestinal (Kleinschmidt y col., 2006). La misma conclusión ha sido alcanzada para la especie felina (Kleinschmidt y col., 2010).

2.5 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS LINFOMAS APLICADA A LA ESPECIE CANINA

A lo largo del tiempo, se han utilizado diversas clasificaciones de los linfomas caninos, basadas en las existentes para medicina humana, como las de Rappaport (1966), Kiel (Lennert y col., 1975; Lennert y col., 1992), Working Formulation (Nacional Cancer Institute, 1982), o la REAL - Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasms (Harris y col., 1994); y, posteriormente, la OMS -Organización Mundial de la Salud- (Harris y col., 1997; Harris y col., 1999).

Clasificación de Rappaport

La clasificación de Rappaport (1966) se propuso antes de de que se utilizasen los antígenos de superficie para identificar el linaje de las poblaciones linfocitarias, y ha caído actualmente en desuso. En la especie canina, Teske y colaboradores (1974) estudian 114 linfomas que clasifican, según la clasificación de Rappaport, como histiocíticos, linfocíticos pobremente diferenciados, y mixtos histiocíticos y linfocíticos.

Clasificación de Kiel

En los años 70, tras el descubrimiento de de los marcadores de superficie para la diferenciación de los linfocitos (Shevach y col., 1973; Jaffe y col., 1977), varios grupos de patólogos de medicina humana publican propuestas para la clasificación de los linfomas (Lukes y col., 1974; Gerard-Marchant y col., 1974; Bennet y col., 1974; Lennert y col., 1975). La más significativa de éstas fue la clasificación de Kiel, que se describió primero en 1975 (Lennert y col., 1975), y se completó en el año 1978, en un monográfico publicado por Lennert y colaboradores, para ser actualizada de nuevo en 1992 (Lennert, 1978; Lennert y col., 1992).

La clasificación de Kiel ha sido muy utilizada, tanto en medicina humana como en la especie canina, y es la siguiente:

- Linfomas de células B:
 1. Linfomas de bajo grado:
 - Células pequeñas: linfocítico, linfoplasmacítico, prolinfocítico y centrocítico.
 - Centroblástico-centrocítico
 - De células macronucleadas de mediano tamaño.
 2. Linfomas de alto grado:
 - Centroblástico (monomórfico y polimórfico).
 - Linfoblástico
 - Inmunoblástico
 - De células pequeñas inclasificable (tipo Burkitt y plasmocitoide).
- Linfomas de células T
 1. Linfomas de bajo grado:
 - De células pequeñas: células claras, prolinfocítico y pleomórfico de células pequeñas.
 - Micosis fungoide
 2. Linfomas de alto grado:
 - Pleomórfico, mixto, de células pequeñas y grandes
 - Pleomórfico de células grandes
 - Inmunoblástico
 - Inclasificable plasmocitoide
 - Linfoblástico

Esta clasificación, especialmente extendida en Europa, fue aplicada a la especie canina por Teske en 1974 y después por Valli en 1981, y se ha seguido utilizando en estudios relativamente recientes (Fournel-Fleury y col., 2002; Sözmen y col., 2005; Ponce y col., 2004; Sokolowska y col., 2005; Ponce y col., 2010; Saperzynski y col., 2010). Se trata de una clasificación extensa que, en su versión actualizada, divide por primera vez los linfomas en linfomas de células B y de células T y, por lo tanto, sólo puede utilizarse cuando se han realizado técnicas especiales para detectar el inmunofenotipo de los linfomas (Teske y col., 1994; Kiupel y col., 1999). Las neoplasias se agrupan según rasgos histológicos en linfomas de alto grado (predominan las células grandes, llamadas “-blastos”), y de bajo grado (predominan las células pequeñas, llamadas “-citos”). Pese a ser muy utilizada en Europa, tuvo escasa difusión en Estados Unidos (Jaffe y col., 2008).

Fournel-Fleury y colaboradores, en 2002, estudian 46 casos de linfoma multicéntrico canino tipo T y encuentran 13 linfomas de bajo grado y 33 de alto grado, según la clasificación de Kiel. Entre los de bajo grado, cinco eran de células pequeñas claras, tres eran pleomórficos de células pequeñas, y cinco micosis fungoides. Entre los de alto grado, once eran pleomórficos mixtos de células grandes y pequeñas, seis pleomórficos de células grandes, once linfoblásticos y cinco inclasificables plasmocitoides. Coincidiendo con el estudio de Fournel-Fleury del año 2002, Sözman y colaboradores, en 2005, encuentran también una predominancia de los linfomas de alto grado sobre los de bajo grado, según la clasificación de Kiel: entre los linfomas de tipo B, 6 son de bajo grado (12%) y 26 de alto grado (52%), y entre los de tipo T, 2 son de bajo grado (4%) y 14 son de alto grado (28%). Sapiersynski y colaboradores (2010) realizan un estudio en el encuentran un 86% de linfomas de alto grado, frente a un 14% de bajo grado. Las muestras de estos trabajos habían sido obtenidas mediante aspirados con aguja fina o biopsias de ganglios linfáticos, y en ninguno de ellos se incluían linfomas gastrointestinales.

Clasificación de la Working Formulation

Al mismo tiempo que surgían estas clasificaciones se avanzaba también, sobre todo en medicina humana, en el conocimiento de las neoplasias a nivel clínico, y en los protocolos de tratamiento, de forma que se puso de manifiesto el comportamiento heterogéneo entre los distintos tipos de linfoma (Van y col., 1975; Rosenberg y col., 1975). Se realizaron varios encuentros entre patólogos, para tratar de llegar a un consenso y a un criterio común, hasta que el National Cancer Institute (EE.UU.) dirigió un estudio para evaluar las clasificaciones publicadas hasta el momento. Ninguna de las clasificaciones parecía ser claramente mejor, y los patólogos no conseguían llegar a un acuerdo. De todo esto surgió una nueva clasificación que reunía todas las anteriores, la clasificación de la Working Formulation (National Cancer Institute, 1982). Esta clasificación divide a los linfomas en bajo, intermedio y alto grado; y, a su vez, dentro de estos tres grados, establece diferentes categorías, atendiendo a la arquitectura, al índice mitótico y al tipo celular. Además, clasificaba los linfomas en función del comportamiento clínico, pensando en el manejo de los pacientes. Esta clasificación no incluyó el inmunofenotipo, ya que en aquel entonces se consideraba fuera del alcance de la mayoría de laboratorios de patología. Se trató de unificar categorías y, por ello, las nuevas categorías eran bastante heterogéneas. Muchos consideran que esta clasificación supuso un paso hacia atrás frente a la clasificación de Kiel, ya que hacía distinciones que no podían

validarse, basadas en diferenciaciones morfológicas cuestionables, los grupos clínicos no pudieron ser confirmados, y además no tenía en cuenta el inmunofenotipo. Esta clasificación se hizo más popular entre los clínicos, y se utilizó en muchos centros de Estados Unidos para ensayos clínicos. Sin embargo, la clasificación de Kiel siguió siendo la más utilizada en Europa y Asia, lo que causó problemas para patólogos y clínicos a la hora de interpretar resultados de los estudios publicados (Jaffe y col., 2008).

La clasificación de la Working Formulation también ha sido utilizada en la especie canina (Teske y col., 1974; Carter y col., 1986). Se extendió sobre todo por Norteamérica (Greenlee y col., 1990). Greenlee y colaboradores, en 1990, estudiaron 176 casos de linfoma canino que clasificaron según lo descrito en medicina humana en las clasificaciones de Kiel y Working Formulation, concluyendo que la clasificación de Kiel fue la más útil para aplicar a la especie canina.

Pese a que algunos autores todavía hacen referencia a la clasificación de la Working Formulation (Guija de Arespachaga y col., 2007), ha caído prácticamente en desuso. En el estudio de Guija de Arespachaga y colaboradores, en 2007, en 82 casos de linfoma multicéntrico canino predominan los linfomas difusos (99%), sobre los foliculares; y los de grado intermedio son los más frecuentes (61%), seguidos por los de alto grado (23%), resultados que coinciden con trabajos previos (Teske y col., 1974; Greenlee y col., 1990; Teske y col., 1994; Fournel-Fleury y col., 1997).

En las clasificaciones de Rappaport, Working Formulation y Kiel actualizada no se hace ninguna referencia a los linfomas digestivos, y los trabajos que las utilizan en el perro, estudian linfomas multicéntricos.

Clasificación de la REAL (revisada para Europa y América)

En el año 1991 se forma un grupo internacional de patólogos de medicina humana para el estudio de los linfomas (International Lymphoma Study Group) que, en el año 1994, publicará una clasificación para los linfomas a nivel internacional, revisada para Europa y América (REAL) (Harris y col., 1994). En realidad, esta nueva clasificación sigue los criterios y nace a partir de la de Kiel, clasificando los linfomas en tipo B y tipo T, con algunas modificaciones, e incluyendo nuevas entidades. Utiliza rasgos morfológicos, inmunofenotipo,

rasgos genéticos y presentación clínica. Esta clasificación surge del consenso de los 19 miembros del International Lymphoma Study Group, basándose únicamente en datos publicados, y en entidades que estuviesen descritas y validadas en más de una publicación. Por ello, en la creación de esta clasificación se acepta que hay algunas categorías muy amplias que no podían resolverse con el conocimiento existente hasta el momento, como el linfoma B difuso de células grandes o el linfoma T periférico. Con esta clasificación se reconoce a los linfomas como un grupo heterogéneo de enfermedades, y se pretendía que cada tipo de linfoma fuese identificado como una enfermedad, más que como una única enfermedad con un amplio espectro de grados histológicos y presentaciones clínicas. En la clasificación de la REAL se podían establecer gradaciones en una entidad concreta, como por ejemplo el linfoma folicular, pero no a lo largo de un rango de diferentes enfermedades (Jaffe y col., 2008). Publicaciones posteriores avalan los principios de la clasificación de la REAL (The non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997).

Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS)

Poco tiempo después de publicarse la clasificación de la REAL, la Organización Mundial de la Salud (OMS) decide actualizar la clasificación de las neoplasias hematopoyéticas y del sistema linfoide para su serie de “libros azules” de Clasificación de Tumores. Esta tarea la lleva a cabo la Sociedad de Hematopatología y la Asociación Europea de Hematopatología, a lo largo de siete años con el propósito de llegar a un consenso. Finalmente la OMS adoptó casi intacto el sistema de clasificación de la REAL para medicina humana (Harris y col., 1997; Harris y col., 1999), con revisiones posteriores de esta clasificación (Hamilton y col., 2000; Swerdlow y col., 2008; Bosman, 2010), que han incluido nuevas entidades, se han reconocido pequeñas poblaciones linfoides clonales, y se han identificado enfermedades caracterizadas por la afectación de regiones anatómicas específicas.

En el año 2002 la OMS publica la clasificación revisada para el linfoma en Europa y América (REAL) para los animales domésticos (Valli y col., 2002). La clasificación es la siguiente:

1. Neoplasias linfoides de células B:

- Neoplasias de precursores de células B:
 - Leucemia /linfoma linfoblástico de células B.
- Neoplasias de células B maduras:

- Leucemia / linfoma linfocítico crónico de células B.
- Linfoma linfocítico de tipo intermedio de células B (LLI).
- Linfoma linfoplasmacítico (LPL).
- Linfomas foliculares.
- Linfoma extranodal de la zona marginal de tejido linfoide asociado a las mucosas (linfoma MALT).
- Leucemia de células pilosas.
- Tumores plasmacíticos:
 - Plasmacitoma indolente.
 - Plasmacitoma anaplásico.
 - Mieloma de células plasmáticas.
- Linfomas de células B grandes:
 - Linfoma B rico en células T.
 - Linfoma inmunoblástico de células grandes.
 - Linfoma B difuso de células grandes.
 - Linfoma tímico de células B.
 - Linfoma intravascular de células B.
- Linfoma tipo Burkitt.
 - Linfoma B de alto grado tipo Burkitt.

2. Neoplasias linfoides de células T y NK (Natural Killer):

- Neoplasias de precursores de células T:
 - Leucemia/linfoma linfoblástico de células T.
- Neoplasias de células T y NK maduras:
 - Desórdenes linfoproliferativos de linfocitos grandes granulares (LGL):
 - Leucemia linfocítica crónica de células T.
 - Leucemia /linfoma LGL de células T.
 - Leucemia linfocítica crónica de células NK.
 - Neoplasias cutáneas de células T:
 - Linfoma cutáneo epiteliotrópico.
 - Linfoma cutáneo no epiteliotrópico.
 - Linfoma extranodal /periférico de células T:
 - Linfoma / leucemia de células T adultas.
 - Linfoma angioinmunoblástico.
 - Linfoma angiotrópico:
 - Linfoma angiocéntrico.
 - Linfoma angioinvasivo.
 - Linfoma intestinal de células T.

- Linfoma anaplásico de células grandes (ALCL).

3. Tumores (miscelánea):

- Linfoma tipo Hodgkin.

Varios trabajos utilizan la clasificación de la OMS en los linfomas multicéntricos caninos, basándose para la clasificación en los criterios de tamaño celular, forma del núcleo, número, tamaño y distribución de nucleolos, densidad de la cromatina y tamaño del citoplasma, como ocurría en la clasificación para medicina humana (Sueiro y col., 2004; Lurie y col., 2008; Vezzali y col., 2010; Ponce y col., 2010). Recientemente se publica un trabajo muy exhaustivo con la clasificación de la OMS para los linfomas caninos, incluyendo un total de 43 tipos de linfoma B y T (Valli y col., 2011). En este trabajo se evalúan 300 casos de linfoma multicéntrico por 20 patólogos experimentados, tratando de llegar a consensos, evaluando una serie de parámetros: patrón difuso o nodular, tamaño nuclear, morfología del núcleo, índice mitótico e inmunofenotipo. En este trabajo tratan de establecer unos criterios claros de clasificación de cara a futuros estudios pronóstico.

De la clasificación del linfoma digestivo canino se va a hablar más adelante.

2.6 EL LINFOMA INTESTINAL EN MEDICINA HUMANA

Los linfomas alimentarios en medicina humana son más frecuentes en el estómago, seguido de intestino delgado y, por último, de intestino grueso (Koch y col., 2001; Burke y col., 2011; Arora y col., 2011). En intestino delgado, el tramo afectado con más frecuencia es la zona ileocecal, seguida de íleon y duodeno (Koch y col., 2001; Kohno y col., 2003; Radic-Kristo y col., 2010).

En el caso de los linfomas de intestino delgado, la OMS (Hamilton y col., 2000; Ridell y col., 2003; Jaffe y col., 2009; Bosman, 2010), los clasifica en:

- Linfoma T- intestinal, incluyendo linfoma T no asociado a enteropatía, con varias variantes, y linfoma T asociado a enteropatía (EATL). Posteriormente se distinguirá en linfoma T asociado a enteropatía de tipo I y de tipo II (Swerdlow y col., 2008).
- Linfoma B de intestino delgado, con los subtipos: linfoma tipo MALT (de tejido linfoide asociado a mucosas) y su variante recién descrita (Bosman y col., 2010), la enfermedad inmunoproliferativa de intestino delgado (IPSID); linfoma del Manto; linfoma tipo Burkitt; y, otros tipos de linfoma B, especificando que cualquiera de los subtipos B puede darse primariamente en el intestino delgado.

En medicina humana, al contrario que en la especie canina, es más frecuente el linfoma B que el linfoma T, dentro del grupo de linfomas intestinales. Utilizando la clasificación de la OMS, la mayoría de autores coinciden en una frecuencia en torno al 65-85% para los linfomas B, que incluyen el tipo linfoma B difuso de células grandes como el más frecuente, siendo mucho menos frecuentes el linfoma MALT, el linfoma de células del manto, el linfoma Burkitt y el linfoma folicular. El linfoma T es menos frecuente que el B en esta localización, incluyendo principalmente el linfoma T asociado a enteropatía, linfoma T periférico y linfoma extranodal NK/T (Kohno y col., 2003; Yang y col., 2004; Radic-Kristo y col., 2010; Arora y col., 2011; Kim y col., 2011). En el caso de los linfomas intestinales de tipo T, el más frecuente es el linfoma T asociado a enteropatía (Ridell y col., 2003).

El pronóstico en medicina humana, al igual que en el perro, es peor para los linfomas T que para los linfomas B (Kohno y col., 2003; Yang y col., 2004; Kim y col., 2011).

Considerando nuestro estudio en la especie canina, vamos a dedicar el siguiente apartado a realizar una breve descripción de la situación del linfoma T asociado a enteropatía (EATL) en medicina humana.

2.6.1 LINFOMA T ASOCIADO A ENTEROPATÍA (EATL)

La última clasificación de la OMS de medicina humana para tumores hematopoyéticos y de sistema linfoide (Swerdlow y col., 2008; Campo y col., 2011), señala dos formas del linfoma T asociado a enteropatía. Incluye el EATL (enteropathy-associated T-cell lymphoma) tipo II, quedando el descrito previamente como EATL tipo I o clásico. El término linfoma T intestinal, utilizado anteriormente, queda como un término genérico, que debe usarse cuando no se conoce el diagnóstico concreto.

El linfoma T asociado a enteropatía (EATL) es un tumor intestinal caracterizado por la presencia de linfocitos intraepiteliales, y generalmente formado por linfocitos T neoplásicos de tamaño grande, con la presencia de un infiltrado inflamatorio concomitante (Riddell y col., 2003; Burke y col., 2011). En el 10-20% de los casos las células neoplásicas son de tamaño mediano-pequeño, y la población es muy monomórfica. Esta variante monomórfica es la que se ha denominado EATL tipo II (Burke y col., 2011).

Este tipo de neoplasia es más frecuente en el yeyuno o íleon que en duodeno, aunque puede aparecer en cualquier localización de intestino delgado, estómago o colon, e incluso, muy raramente, fuera del aparato digestivo (Burke y col., 2011).

El EATL tipo I aparece con mayor frecuencia en zonas de elevada prevalencia de enfermedad celíaca (Ridell y col., 2003; Burke y col., 2011), asociación que algún autor ha encontrado también para la EATL tipo II (Delabie et al., 2011), aunque se cree que en el caso de la EATL de tipo II no es frecuente (Swerdlow y col., 2008; Burke y col., 2011). Tanto es así que en los pacientes con enfermedad celíaca refractaria se llevan a cabo controles de clonalidad e

inmunofenotipado de linfocitos intraepiteliales debido al riesgo significativo de evolución a EATL. Incluso se está utilizando el término EATL “in situ” para casos en los que los linfocitos intraepiteliales muestran características de malignidad, pero aún no puede detectarse la presencia de linfoma (Swerdlow y col., 2008; Burke y col., 2011; Busto y col., 2011). Se han descrito otras lesiones in situ o lesiones tempranas en otros tipos de linfoma en medicina humana, como el linfoma folicular, o el linfoma de células del manto, ambos de tipo B (Cong y col., 2002; Aqel y col., 2008).

Pese a que el linfoma T asociado a enteropatía se considera poco frecuente, su incidencia ha aumentado significativamente en los últimos 30 años, como reflejo, quizá, del incremento en el número de casos de enfermedad celíaca, y del mejor reconocimiento de este tipo de linfoma T (Sharaiha y col., 2011). En las zonas que no son endémicas para la enfermedad celíaca, como China, su diagnóstico es raro, e incluye sobre todo el linfoma asociado a enteropatía de tipo II o linfoma T periférico no especificado (Sun y col., 2011).

Macroscópicamente, el linfoma T asociado a enteropatía suele presentarse como múltiples masas pequeñas ulceradas, en la mucosa intestinal, aunque también puede presentarse como una o más úlceras o como una única masa grande de tipo exofítico. La morfología celular es muy variada, siendo lo más común una población relativamente monótona de células medianas o grandes con un núcleo redondo o vesicular, nucleolo prominente y moderado a abundante citoplasma. No es común la presencia de pleomorfismo celular y células multinucleadas. Sin embargo, en la EATL tipo II las células neoplásicas son medianas, con un núcleo redondo e intensamente teñido y escaso citoplasma pálido. El infiltrado inflamatorio concomitante puede ser tan abundante que llegue a dificultar la detección de pequeñas poblaciones de células tumorales. En las zonas adyacentes a las zonas tumorales aparece un infiltrado de linfocitos y células plasmáticas, con la presencia de linfocitos intraepiteliales, y atrofia de las vellosidades intestinales (Swerdlow y col., 2008; Burke y col., 2011).

Los linfomas EATL tipo I y tipo II se diferencian también en la expresión de algunos marcadores de linfocitos. El EATL tipo II expresa CD8 y CD56 con más frecuencia que el tipo I, que presenta una expresión de CD8 alrededor del 20%, y de CD56 menor del 10%, según algunos estudios (Chott y col., 1999; Swerdlow y col., 2008; Burke y col., 2011; Delabie y col., 2011; Campo y col., 2011).

2.7 EL LINFOMA INTESTINAL EN EL PERRO

El linfoma intestinal canino se caracteriza por una infiltración mucosa, submucosa o epitelial de linfocitos neoplásicos, que pueden invadir el intestino de forma difusa o localizada. La forma difusa es más frecuente, y normalmente produce malabsorción (Hall y col., 2007).

Según la clasificación de la OMS (Head y col., 2003), podemos encontrar tres patrones para el linfoma alimentario canino:

- Linfoma B del tejido linfoide asociado a mucosas (linfoma MALT): un linfoma de bajo grado que surge a partir del tejido linfoide asociado a mucosas y suele darse junto con un proceso inflamatorio subyacente. Se acompaña de lesiones linfoepiteliales y folículos linfoides reactivos, y puede evolucionar a linfoma de alto grado.
- Desorden linfoproliferativo granular de células grandes (linfoma de células granulares): se trata de un linfoma de células T o NK con grandes gránulos azurófilos en su citoplasma. Es un linfoma muy raro, que se ha descrito en el gato (Pohlman y col., 2009), y también en un perro de raza bóxer (Lurie y col., 2008).
- Linfoma T-intestinal: es el más frecuente, un linfoma de células pequeñas, difícil de diferenciar de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal, y que frecuentemente se acompaña de ésta.

Más tarde se habla de “**linfoma T tipo enteropatía**” en lugar de linfoma T-intestinal, como análogo al linfoma intestinal asociado a enteropatía de medicina humana que se ha descrito previamente. Histológicamente, este tipo de linfoma, en el perro, se acompaña de acortamiento y fusión de vellosidades intestinales junto con un engrosamiento de la lámina propia o de la zona glandular. Encontraremos un infiltrado importante de linfocitos pequeños en el epitelio de las vellosidades, y una infiltración variable de linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia (Valli, 2007). Valli describe un estado en el que el cambio neoplásico puede estar presente en células aisladas, aún siendo la

imagen general la de una enfermedad inflamatoria crónica intestinal grave pero benigna; de manera que la diferenciación y el reconocimiento de la transición hacia un estado verdaderamente neoplásico es muy sutil y representa una de las más difíciles interpretaciones de la histopatología, tanto en medicina humana como en los animales (Valli, 2007).

En el caso de un linfoma T tipo enteropatía, el carácter de las células es ligeramente diferente, observándose linfocitos más grandes (1,5 veces el tamaño de los glóbulos rojos), algo irregulares, con un solo nucleolo central y la cromatina densamente teñida y uniformemente dispersa y una media luna de citoplasma muy fina y clara, difícilmente perceptible en biopsias endoscópicas bien fijadas. Además, la disposición de los linfocitos intraepiteliales, que pueden estar también presentes en un IBD grave, será más irregular, de manera que podemos encontrar vellosidades con un infiltrado leve, y vellosidades adyacentes con un infiltrado muy intenso. La presencia de mitosis es muy rara en este tipo de neoplasia. Si es posible realizar inmunofenotipo se observarán áreas sólidas de marcaje de tipo T (Valli, 2007).

En el perro, no hay trabajos realizados en linfoma gastrointestinal que clasifiquen los patrones morfológicos según la OMS. Sí está descrita, como un hallazgo frecuente, la presencia de epiteliotropismo, como la infiltración de linfocitos maduros que forman pequeños grupos en el interior del epitelio, que llega a definir el linfoma intestinal epiteliotrópico (Steinberg y col., 1995; French y col., 1996). La caracterización inmunohistoquímica de estas células pone de manifiesto que se trata siempre de linfocitos tipo T. Ozaki y colaboradores describen la presencia de epiteliotropismo en el 75% de los 11 linfomas de tipo T-intestinal que estudian (Ozaki y col., 2006), porcentaje muy similar al de otro estudio, que incluye linfomas de tipo T y de tipo B en diferentes localizaciones del tracto gastrointestinal, de manera que todos los linfomas de tipo T presentaron epiteliotropismo (Coyle y col., 2004). El epiteliotropismo es un rasgo muy estudiado en la especie felina, que incluso se considera como una entidad independiente, el linfoma T-epiteliotrópico (Krecic y col., 2000; Carreras y col., 2003). En el gato hay trabajos que describen otros patrones morfológicos para el linfoma intestinal (Pohlman y col., 2009; Vezzali y col., 2010; Moore y col., 2012). Moore y colaboradores, en el año 2012, realizan un estudio sobre el linfoma gastrointestinal felino en el que incluyen por primera vez las entidades de la OMS, EATL tipo I y EATL tipo II, hasta entonces utilizadas para medicina humana (Moore y col., 2012). En este trabajo también describen casos de linfoma B difuso de células grandes, que aparecía en la clasificación general de

los linfomas de la OMS para los animales domésticos (Valli y col., 2002), pero no en la de el linfoma alimentario (Head y col., 2003). Este es el linfoma B más frecuente en el trabajo de Moore y colaboradores (2012), y también lo es para otros autores (Pohlmann y col., 2009; Vezzali y col., 2010).

La principal aplicación de estas clasificaciones es la relación de los subtipos morfológicos con el pronóstico. Hoy en día está comúnmente aceptado, tanto en medicina humana como en el perro y el gato, que los linfomas de tipo T tienen peor pronóstico que los de tipo B (Greenlee y col., 1990; Teske y col., 1994; Kiupel y col., 1999; Phillips y col., 2000; Dobson y col., 2001). Sin embargo, no se han sacado conclusiones sólidas de la relación entre los subtipos morfológicos y el pronóstico (Dobson y col., 2001), aunque hay estudios que encuentran algunas asociaciones (Ponce y col., 2004).

El linfoma multicéntrico en el perro es más frecuente de tipo B que de tipo T, con porcentajes entorno al 60-74% de los casos en la mayoría de estudios consultados (Ponce y col., 2010; Sözmen y col., 2005; Teske y col., 1994; Ruslander y col., 1997; Guija de Arespacochaga y col., 2007; Fournel-Fleury y col., 2002). Existe una posible excepción, en la raza bóxer. Un trabajo confirma que es mucho más frecuente el linfoma tipo T (85%) que el tipo B (12,5%), cuando sólo 8 de los 43 linfomas estudiados eran alimentarios (Lurie y col., 2008).

Inicialmente se creía que probablemente el linfoma alimentario canino fuese más frecuente de inmunofenotipo B (Guilford y col., 1996). Sin embargo, parece que el linfoma alimentario es más frecuente de tipo T que de tipo B, tanto en el perro como en el gato. Coyle y colaboradores encuentran un 75% de linfomas de tipo T, del total de linfomas alimentarios que estudian (n = 44) (Coyle y col., 2004). Frank y colaboradores describen 12 casos de linfoma T en un total de 19 perros con linfoma gastrointestinal con tejido disponible para realizar inmunofenotipo (Frank y col., 2007). Después, Rassnick y colaboradores, encuentran un 63% de linfomas de tipo T de un total de 18 perros con linfoma con afectación gastrointestinal (Rassnick y col., 2009). Otros estudios, con menor número de casos, también encuentran el linfoma T más frecuente que el linfoma B (Miura y col., 2004; Ozaki y col., 2006). A pesar de todo, aún hacen falta estudios más amplios para afirmar esta predominancia de los linfomas T intestinales en el perro.

En el gato existen estudios más amplios que en el perro sobre el linfoma digestivo, dada su mayor prevalencia en esta especie, y es conocida la mayor frecuencia del linfoma de tipo T en esta localización (Zwahlen y col., 1998; Moore y col., 2005; Cesari y col., 2009; Briscoe y col., 2011; Kiupel y col., 2011; Moore y col., 2012). Aunque también hay trabajos que describen una mayor frecuencia de inmunofenotipo B que de inmunofenotipo T en el linfoma alimentario felino (Waly y col., 2005; Pohlman y col., 2009).

2.8 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LINFOMA INTESTINAL E IBD EN EL PERRO Y EL GATO

2.8.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO DIFERENCIAL DE LINFOMA INTESTINAL E IBD

La enteritis crónica linfoplasmocitaria, el diagnóstico histopatológico más frecuente de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal canina, se caracteriza por la presencia de un importante infiltrado de linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia del intestino. Esta situación aparece tanto en esta enfermedad como en otras, entre ellas el linfoma intestinal, por lo que es necesario descartar el resto y confirmar su condición de idiopática para poder diagnosticarla correctamente (Guilford, 1996).

Cuando inicialmente se describió esta enfermedad, en el año 1954, se sugirió una semejanza con la enfermedad de Crohn, una de las presentaciones del IBD en medicina humana (Strande y col., 1954). Sin embargo, posteriormente se decidió que la enfermedad inflamatoria crónica intestinal canina no es tan parecida a la del hombre como para utilizarse modelos animales (Jacobs y col., 1990; Jergens y col., 2012).

La enfermedad inflamatoria crónica intestinal (IBD) se considera, hasta el momento, al igual que el linfoma intestinal, una enfermedad característica de perros de edad media o avanzada, en la que no existe una predisposición sexual conocida, y tampoco una clara predisposición racial, pese a que algunos autores sugieren una mayor frecuencia de presentación en la raza Pastor Alemán (Jacobs y coll., 1990; Jergens y col., 1992; Guilford, 1996; Tams, 2003; Hall y col., 2007; Jergens y col., 2012).

Los signos clínicos asociados al IBD son, fundamentalmente, vómitos, diarrea, pérdida de peso y alteraciones del apetito, en un cuadro generalmente crónico, similar al que podemos encontrar en el linfoma intestinal (Jacobs y col., 1990; Jergens y col., 1992; Guildford, 1996; Rodríguez-Franco y col., 2002; Jergens y col., 2012). Con el fin de unificar criterios en la valoración clínica de esta enfermedad en el perro, y de otorgarle una gradación, se han propuesto

varios índices de actividad clínicos (Jergens y col., 2003; Rodríguez-Franco y col., 2004; Allenspach y col., 2007).

Al igual que en el linfoma intestinal, es muy frecuente la presencia de hipoproteinemia, que se ha asociado con un peor pronóstico de la enfermedad (Jacobs y col., 1990; Peterson y col., 2003; Craven y col., 2004; Allenspach y col., 2007; Jergens y col., 2012). Se ha descrito la presencia de hipoproteinemia hasta en un 65% de los casos de IBD (Craven y col., 2004). En el IBD la mayoría de autores coinciden en que lo más frecuente es que no se presenten alteraciones en el hemograma (Tams, 1992; Tams, 2003; Guildford y col., 1996; García-Sancho y col., 2007), aunque podemos encontrar anemia, reflejo de inflamación crónica o de la pérdida de sangre con las heces, o leucocitosis con neutrofilia, hallazgos también presentes en el linfoma intestinal (Guildford, 1996; Jergens y col., 2012). Hay autores que indican una frecuencia considerable de alteraciones inespecíficas en el hemograma de perros con enfermedad inflamatoria crónica intestinal, con porcentajes del 64% (Jergens y col., 1992), o del 32% (Craven y col., 2004).

El diagnóstico de IBD es un diagnóstico de exclusión, y requiere la utilización de un protocolo diagnóstico que es el mismo que hemos descrito para el linfoma intestinal. El diagnóstico clínico de IBD se basa en la presencia de signos gastrointestinales persistentes (de más de tres semanas de duración), la imposibilidad de encontrar otras causas para los signos clínicos, y la confirmación histopatológica de un infiltrado inflamatorio intestinal (Jergens y col., 1992; Allenspach y col., 2007; Washabau y col., 2010; Jergens y col., 2012).

En cuanto al diagnóstico por imagen, la radiología no ofrece muchos datos específicos para esta enfermedad, es de más ayuda para la evaluación de desórdenes extra-intestinales que causan gastroenteritis. La ecografía abdominal es más adecuada para la valoración de enfermedades que afectan de forma difusa a la mucosa intestinal, como es el caso del IBD y, en ocasiones, del linfoma intestinal (Jergens y col., 2012). El aspecto ecográfico de IBD y linfoma intestinal puede, frecuentemente, superponerse, cuando se trata de un linfoma difuso. Sin embargo, existen hallazgos más frecuentes en una que en otra enfermedad, y la correcta interpretación de los datos ecográficos nos puede ayudar a orientar el diagnóstico (Gaschen y col., 2011).

La ecografía permite la valoración del grosor de la pared intestinal, así como de linfadenopatías mesentéricas, que pueden encontrarse tanto en el

linfoma como en el IBD (Gaschen y col., 2008; Jergens y col., 2012). En el IBD los ganglios regionales pueden aparecer aumentados de tamaño; y, aunque es más frecuente que mantengan su forma y ecogenicidad, sí pueden aparecer mal definidos (Nyman y col., 2004). Los cambios ecográficos en el IBD suelen ser difusos, aunque también pueden darse casos focales o segmentales. Lo más frecuente es encontrarnos con un engrosamiento de la pared intestinal de leve a moderado en el que se conserva la diferenciación de las capas (Gaschen y col., 2008; Rudolf y col., 2005; Penninck y col., 2003). Parece que la diferenciación de capas suele conservarse en el IBD, mientras es más frecuente que se pierda en el linfoma. Sin embargo, no siempre es así, ya que en el IBD puede aparecer también una pérdida de diferenciación de capas, debida a fibrosis, edema, hemorragias, úlceras, o bien, por una infiltración linfoplasmocitaria muy grave (Konde y col., 2003; Gaschen y col., 2011; Penninck y col., 2008).

Se ha descrito el engrosamiento único de la capa muscular en la enteritis linfoplasmocitaria en el perro (Gaschen y col., 2008); y, sobre todo, en el gato, tanto en la enteritis linfoplasmocitaria como en la eosinofílica (Penninck y col., 2008). Sin embargo, en gatos mayores con una evidencia ecográfica de engrosamiento de la capa muscular de la pared intestinal, es más probable que presenten un linfoma que un IBD (Zwingenberger y col., 2010). En el estudio de Zwingenberger y colaboradores, la presencia de linfadenopatías era más frecuente en gatos con linfoma que en gatos sanos, pero no era significativamente superior que en los gatos con IBD (Zwingenberger y col., 2010).

Penninck y colaboradores tratan de valorar la utilidad de la ecografía en el diagnóstico diferencial entre enteritis crónica y neoplasia intestinal en el perro, concluyendo que la pérdida de diferenciación de capas era un excelente factor predictivo para diferenciar ambos grupos de patologías, siendo 50.9 veces más frecuente la presencia de un tumor que de una enteritis en su población de 150 perros incluidos en el estudio retrospectivo. Además, el engrosamiento de la pared intestinal resultó estadísticamente superior en los casos de linfoma que en los de inflamación (Penninck y col., 2003).

Se han correlacionado los hallazgos ecográficos con el índice de actividad clínica del IBD en las fases iniciales de presentación de la enfermedad, cuando es clínicamente activa. Sin embargo, no se ha demostrado correlación de la mejoría clínica con mejoría ecográfica (Gaschen y col., 2008).

En cuanto a la imagen endoscópica del IBD, los hallazgos más frecuentes incluyen una mucosa intestinal friable, irregular, y la presencia de soluciones de continuidad (Allenspach y col., 2007; García-Sancho y col., 2007; Jergens y col., 2012). Recientemente se han publicado una serie de parámetros, en un formulario que trata de unificar criterios respecto a la gravedad de la imagen endoscópica del tracto gastrointestinal superior e inferior. Esto lo ha llevado a cabo el Grupo de Estandarización Gastrointestinal de la WSAVA - World Small Animal Veterinary Association (Day y col., 2008; Washabau y col., 2010), para la evaluación de inflamación gastrointestinal en animales de compañía. Todavía no existen estudios que valoren la utilidad de estos parámetros, y no existen parámetros estandarizados para valorar la imagen endoscópica del linfoma intestinal. Estudios previos a la publicación de estos estándares habían tratado de relacionar el grado de lesiones endoscópicas con el índice de actividad clínico de la enfermedad, sin encontrarse correlación significativa (Allenspach y col., 2007; García-Sancho y col., 2007). El aspecto endoscópico de las lesiones en un linfoma digestivo, cuando éste aparece de forma difusa, es el de una mucosa irregular, que recuerda a las lesiones presentes en la enfermedad inflamatoria crónica intestinal (Roth y col., 1990; Tams, 2003; Miura y col., 2004)

2.8.2 DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DIFERENCIAL DE LINFOMA INTESTINAL E IBD

El diagnóstico, tanto del IBD como del linfoma alimentario, requiere, necesariamente, el estudio histopatológico de biopsias intestinales. Sin embargo, el diagnóstico diferencial entre IBD y linfoma intestinal ha demostrado ser, en algunos casos, complicado, tanto en la especie felina como en la canina, especialmente en las biopsias endoscópicas. Éstas, precisan ser de calidad para facilitar un diagnóstico adecuado; y además, deben tomarse múltiples biopsias de diferentes zonas del duodeno para aumentar las posibilidades de éxito en el diagnóstico, ya que podemos encontrarnos ante lesiones “parcheadas”, incluso en la porción afectada de intestino (Willard y col., 2001; Willard y col., 2008).

En el perro, un estudio consideró que eran necesarias entre 6 y 7 biopsias “adecuadas”, o de 10 a 15 “superficiales” de estómago o duodeno para el diagnóstico fiable de un infiltrado celular de leve a moderado (Willard y col., 2008). En general, se considera que son necesarias un mínimo de 8-10 biopsias para realizar un diagnóstico fiable de linfoma intestinal (Tams, 2003). La calidad

del tejido biopsiado tiene un impacto importante en la sensibilidad del diagnóstico de biopsias endoscópicas para estas dos enfermedades, siendo las biopsias que se encuadran dentro de la categoría de “adecuadas” (Willard y col., 2008) las más apropiadas. Willard y colaboradores describen que al aumentar la calidad de las biopsias endoscópicas, el número de biopsias necesarias para evidenciar las lesiones disminuye significativamente (Willard y col., 2008). Incluso hay estudios que sugieren que biopsiando sólo el duodeno se puede realizar un diagnóstico erróneo, haciéndose necesarias biopsias también de íleon para afinar el diagnóstico en algunos casos (Casmian-Sorroal y col., 2010). Esto es especialmente importante en el gato, ya que un estudio describe que el linfoma alimentario en esta especie es mucho más frecuente en íleon que en duodeno, de manera que si no se biopsia el área correcta se corre el riesgo de dar un diagnóstico erróneo para los signos clínicos del animal (Evans y col., 2006).

El IBD se caracteriza, histológicamente, por un infiltrado difuso de proporciones variables de linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos, neutrófilos y/o macrófagos, principalmente en la capa mucosa de la pared intestinal. En el caso del linfoma, se trata de una infiltración por linfocitos neoplásicos, que suelen distribuirse de forma irregular entre las vellosidades intestinales, y que frecuentemente invaden la capa submucosa e incluso provocan una infiltración transmural (Gieger y col., 2011). Sin embargo, las biopsias endoscópicas pueden resultar, en ocasiones, muy superficiales, ya que sólo permiten evaluar la capa mucosa, y no permiten detectar lesiones más profundas. Los linfomas intestinales muchas veces están acompañados de lesiones inflamatorias asociadas y podemos observar cambios inflamatorios superpuestos o adyacentes a las zonas neoplásicas, lo que dificulta aún más el diagnóstico, pudiendo llevar a un falso diagnóstico de IBD (Tams, 2003). Un trabajo en la especie felina describe la presencia de una enfermedad inflamatoria intestinal concurrente en el 41% de los 24 casos de linfoma incluidos en el estudio (Briscoe y col., 2011). En otro estudio realizado también en la especie felina, sólo en 3 de los 19 linfomas intestinales estudiados existe un IBD concurrente (Lingard y col., 2009).

En el linfoma intestinal, concretamente en el linfoma T-intestinal, que es el más frecuente y más difícil de diferenciar histológicamente del IBD, existe un acortamiento, engrosamiento y fusión de vellosidades intestinales, con una reducción de la porción de las vellosidades dentro de la capa mucosa, y un engrosamiento de la lámina propia. Aparece un acusado infiltrado de linfocitos pequeños, que llegan a invadir el epitelio; así como una infiltración variable, de

tipo linfoplasmocitario, en la lámina propia. En ocasiones, estos infiltrados se acompañan de dilatación de vasos linfáticos, de la presencia de eosinófilos, e incluso puede haber áreas focales de proliferación de linfocitos de tipo B a la altura de la muscular de la mucosa. Puede ser que los cambios neoplásicos estén presentes sólo en células aisladas, y que la imagen general sea la de una lesión benigna, como la de una enteritis crónica linfoplasmocitaria de tipo epiteliotrópico. En estos estadíos, la transición hacia neoplasia es muy sutil, y su detección resulta de extrema dificultad para patólogos experimentados, tanto en medicina humana, como en el perro y el gato. Esta diferenciación debe realizarse atendiendo al cambio en el carácter neoplásico de las células que forman el infiltrado, que tendrán un núcleo mayor y de forma más irregular, alargado y lobulado, con una cromatina intensamente teñida y uniformemente dispersa, con un solo nucleolo central pequeño, tapado por la cromatina. El citoplasma de estas células queda como un borde muy fino que es difícilmente perceptible en biopsias endoscópicas, y algo más aparente en tejidos obtenidos en la sala de necropsias. Por otro lado, en el IBD, la presencia de mitosis es mucho más rara, y en general encontramos un infiltrado con células de apariencia más homogénea (Valli y col., 2007).

Algunos autores han descrito fuertes inconsistencias en la interpretación de biopsias intestinales, de origen endoscópico, entre diferentes patólogos, variando los diagnósticos incluso entre IBD de carácter leve y linfoma según el patólogo consultado, y poniendo de manifiesto la necesidad de estandarización de las descripciones anatomopatológicas del tejido intestinal para ambas especies, perros y gatos (Willard y col., 2002; Willard y col., 2010). Desde la publicación del primer trabajo a este respecto, en el año 2002, se han hecho considerables esfuerzos por estandarizar una serie de parámetros para la enfermedad inflamatoria crónica intestinal, para estómago, duodeno y colon de perros y gatos, a nivel internacional. El Grupo de Estandarización Gastrointestinal de la Asociación Mundial de Veterinaria de Pequeños Animales (WSAVA; Day y col., 2008; Washabau y col., 2010) establecen y describe, a través de fotografías, una serie de parámetros, catalogados en varios grados, para la clasificación de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal. Se esperaba conseguir la aceptación y generalización del uso de estos parámetros para resolver los problemas de discrepancia diagnóstica entre diferentes patólogos, pero parece que sigue habiendo desacuerdos entre patólogos aún utilizando estas guías (Willard y col., 2010; Simpson y col., 2011).

Aún no se ha logrado clarificar el límite entre IBD grave y linfoma intestinal. Se ha observado de manera frecuente que el linfoma intestinal canino estaba acompañado o precedido por una enteritis crónica linfoplasmocitaria de carácter grave (IBD), lo que sugiere una posible evolución de una a otra enfermedad, que no ha sido demostrada (Dandrieux y col., 2008; Rodríguez-Franco y col., 2010; Washabau y col., 2010; Gieger, 2011). Esto ha sido observado también en el gato (Moore y col., 2005; Moore y col., 2012). De manera que el diagnóstico diferencial entre ambas constituye uno de los grandes retos para los patólogos.

Para afinar, en la medida de nuestras posibilidades, el diagnóstico histológico de un linfoma intestinal o un IBD grave en biopsias endoscópicas se requiere la cooperación entre el clínico, el patólogo y el laboratorio. Por todo lo que se ha comentado anteriormente, parece necesario que, para que un patólogo experimentado pueda interpretar correctamente las biopsias gastrointestinales, los endoscopistas se encuentren en condiciones de obtener biopsias de calidad y en número suficiente; y además, que los técnicos de laboratorio estén entrenados para orientar, procesar y teñir estas biopsias. El clínico debe saber cuándo es necesario tomar biopsias gastrointestinales, una vez descartadas otras patologías (Washabau y col., 2010).

Pese a que el linfoma intestinal en el perro es mucho menos frecuente que en gato, presenta ciertas similitudes respecto al linfoma intestinal felino: es también mucho más frecuente de inmunofenotipo T, también aparece asociado a poblaciones celulares de tipo inflamatorio, y presenta un pronóstico y un tratamiento similar (Tams, 2003).

Está descrito que el linfoma intestinal presenta dificultades de diagnóstico, especialmente en biopsias endoscópicas (Valli, 2007; Washabau y col., 2010). En el año 1989, Couto y colaboradores mencionaban la presencia de un infiltrado linfoplasmocitario alrededor de los focos neoplásicos, que dificultaba el diagnóstico de linfoma gastrointestinal en biopsias endoscópicas (Couto y col., 1989). Sin embargo, existen pocos estudios al respecto. De ahí el interés especial del presente trabajo.

En la especie felina está más estudiado el hecho de la dificultad en el diagnóstico de linfoma intestinal frente a IBD. Esto se debe a que en esta especie el linfoma es la neoplasia más frecuente, y en concreto el linfoma alimentario es la forma más común de presentación de este tipo de neoplasia, cosa que no ocurre, como ya se ha comentado, en la especie canina. Varios

trabajos realizados en la especie felina ponen de manifiesto dificultades en el diagnóstico diferencial entre IBD grave y linfoma intestinal, y la imposibilidad, en muchos casos, de realizar un diagnóstico basado sólo en el estudio de biopsias intestinales teñidas con hematoxilina-eosina, especialmente si se trata de biopsias endoscópicas (Evans y col., 2006; Briscoe y col., 2011; Kiupel y col., 2011; Barrs y col., 2012; Moore y col., 2012).

En el año 1995 ya se había publicado un caso con un diagnóstico erróneo de linfoma alimentario en un gato con intolerancia alimentaria (Wasmer y col., 1995). El primer trabajo que pone de manifiesto la dificultad diagnóstica y la posible relación entre el IBD y el linfoma intestinal en el gato data del año 2001 (Krecic y col., 2001). En el año 2003 se publica un caso de un gato con IBD que había sido diagnosticado inicialmente de linfoma intestinal (Ragaini y col., 2003).

Se ha demostrado que, cuando las técnicas rutinarias no permiten el diagnóstico diferencial, resulta de utilidad el estudio del inmunofenotipo de las neoplasias, mediante la expresión inmunohistoquímica de los marcadores CD3, para linfocitos T, y CD79 o CD20 para linfocitos B, entre otros. Los casos de linfoma se caracterizan por la presencia de una población monoclonal de linfocitos B o T (Pohlman y col., 2009). Sin embargo, se debe tener en cuenta que los resultados de las técnicas inmunohistoquímicas son a veces variables y difíciles de interpretar, ya que los anticuerpos utilizados varían entre los distintos laboratorios; y además, la presencia de linfocitos T no es diagnóstica de linfoma, ya que el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), presente en el intestino delgado, consiste esencialmente en linfocitos de tipo T, que puede expandirse en casos de inflamación (Gieger, 2011).

Waly y sus colaboradores (2005) realizan un estudio retrospectivo de 32 gatos con un diagnóstico inicial de linfoma intestinal. Tras analizar las preparaciones con técnicas inmunohistoquímicas, con los marcadores linfocitarios CD3 para linfocitos T y CD79 y BLA-36 para linfocitos B; encuentran una población mixta de linfocitos T y B para cinco de los casos (16%). Concluyen que dichas muestras constituyen casos de IBD que habían sido incorrectamente diagnosticados de linfoma (Waly y col., 2005).

Con la información disponible hasta el momento no era posible llegar a un diagnóstico diferencial fiable en todos los casos, por ello, se empieza a hablar de clonalidad de linfocitos, como una herramienta más para el diagnóstico de linfoma intestinal en el gato, y en el perro. Los estudios más recientes incluyen

clonalidad de linfocitos y se van a tratar más adelante, pero a continuación se incluye la información que aportan estos trabajos en cuanto a histopatología.

Kiupel y colaboradores, en un estudio reciente que incluye PCR para clonalidad de linfocitos, en la especie felina, encuentran varios parámetros histopatológicos importantes en la diferenciación entre linfoma intestinal e IBD, como son la infiltración linfocitaria más allá de la capa mucosa (parámetro imposible de evaluar en biopsias endoscópicas), el epiteliotropismo, especialmente en forma de nidos o placas; y la anisocitosis y tamaño nuclear de los linfocitos (Kiupel y col., 2011).

Otro artículo reciente, de Briscoe y colaboradores, sigue la misma línea. Se trata de un estudio de 53 casos de IBD y linfoma duodenal de bajo grado, tanto en biopsias endoscópicas como excisionales, utilizando tinciones de hematoxilina y eosina, y técnicas de inmunohistoquímica para CD3, CD79 y MHCII. Encuentran una serie de parámetros histopatológicos asociados al linfoma alimentario, como son el epiteliotropismo o la infiltración profunda (parámetros que coinciden con los de Kiupel y col., 2011), y además una infiltración linfocitaria más grave y unos cambios en la arquitectura de criptas y vellosidades más notables que en los casos de IBD. La expresión de CD3 y CD79 resulta de gran utilidad en la diferenciación de IBD y linfoma intestinal. Concretamente, 28 de los 29 casos de linfoma presentan un inmunofenotipo T y una clara predominancia de células CD3 positivas, mientras que los IBDs presentan una infiltrado de tipo mixto, con linfocitos de tipo B y de tipo T (Briscoe y col., 2011). La utilidad de esta técnica ya había sido descrita para el linfoma intestinal felino (Waly y col., 2005; Pohlman y col., 2009; Kiupel y col., 2011).

Moore y colaboradores recientemente realizan un estudio del linfoma gastrointestinal felino, incluyendo arquitectura, inmunofenotipo y clonalidad linfocitaria. Determinan que el epiteliotropismo es un importante rasgo diagnóstico del linfoma gastrointestinal felino cuando está presente (62% de los casos de este estudio). En la caracterización de los linfomas T menos graves, a veces nombrados como “emergentes” describen una infiltración parcheada de la lámina propia y el epitelio, de manera que es posible encontrar vellosidades con una alta infiltración adyacentes a vellosidades en las que no se observaban cambios neoplásicos. Además, en algunos casos de linfoma temprano describen una infiltración en forma de banda, en la zona de unión de vellosidades y criptas (Moore y col., 2012); ambos patrones que ya habían sido sugeridos en esta especie (Richter y col., 2003).

2.8.3 CLONALIDAD DE LINFOCITOS EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LINFOMA INTESTINAL E IBD

Una neoplasia se forma por la expansión clonal de una sola célula precursora que ha sufrido un daño genético, por lo que los tumores son monoclonales. En las neoplasias linfoides, la reorganización génica precede a la transformación tumoral, de modo que las células derivan de un mismo progenitor y comparten la misma configuración y secuencia génica de los receptores de antígenos. Por tanto, sintetizan las mismas proteínas para los receptores de antígenos en el caso de los linfocitos T, o de los receptores de inmunoglobulinas para los linfocitos B. Por el contrario, una respuesta inmunitaria normal comprende una población policlonal de linfocitos que expresan diferentes receptores de antígenos. Así, para diferenciar proliferaciones linfoides reactivas (policlonales), de proliferaciones neoplásicas (monoclonales) podemos analizar los genes de los receptores de antígenos y las proteínas que producen (Kusewitt y col., 2012).

Para estudiar la clonalidad de los linfocitos T y B se utilizan marcadores para la reorganización génica del receptor de antígenos de células T (TCR) y del receptor de inmunoglobulinas, respectivamente (Stricker y col., 2010). Este tema se está estudiando actualmente en las especies canina y felina, como se explicará a continuación.

En medicina humana, existe un protocolo estandarizado para detectar clonalidad en pacientes con una enfermedad linfoproliferativa sospechosa, que alcanza sensibilidades del 94% para neoplasias de tipo T y 99% para neoplasias de tipo B (van Krieken y col., 2007).

2.8.3.1 CLONALIDAD DE LINFOCITOS EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LINFOMA INTESTINAL E IBD EN LA ESPECIE FELINA

La técnica de PCR puede resultar muy útil para confirmar el diagnóstico de linfoma gastrointestinal, ya que permite amplificar secuencias únicas de ADN, que codifican regiones altamente variables de los receptores de células T (TCR) o de inmunoglobulinas, para las células B. De este modo, permite detectar la expansión clonal de los linfocitos en los casos de linfoma, frente a la existencia

de una población policlonal mixta de linfocitos en los casos de IBD (Stricker y col., 2010).

Moore y colaboradores, en el año 2005, estudiaron biopsias intestinales de 28 casos diagnosticados de linfoma intestinal de tipo T con técnicas histológicas rutinarias e inmunohistoquímica. Por primera vez, pusieron a punto técnicas de PCR para clonalidad de linfocitos T, diseñando cebadores adecuados para amplificar el conjunto de genes que codifican los receptores gamma de células T (TCR γ) para esta especie. Detectaron una expansión clonal en 22 de los 28 casos, y oligoclonal en 3; mientras que encontraron una expansión policlonal de estos receptores en los 9 gatos con IBD y en tres gatos con tejido intestinal sano (Moore y col., 2005). En el mismo año, Werner y colaboradores describen y ponen a punto técnicas de PCR para la clonalidad de linfocitos B, para el conjunto de receptores de inmunoglobulinas de cadena pesada. En este trabajo, la sensibilidad de la técnica es del 68,2% para los linfomas B (Werner y col., 2005).

Kiupel y colaboradores, en un estudio reciente, tratan de establecer un algoritmo para el diagnóstico diferencial entre IBD y linfoma en biopsias de duodeno, tanto endoscópicas como quirúrgicas, en la especie felina. Para ello realizan un estudio retrospectivo en 63 gatos, utilizando inmunohistoquímica para los marcadores linfocitarios CD3 (para linfocitos T) y CD79 (para linfocitos B), y PCR específica para clonalidad linfocitaria. Encuentran varios parámetros histopatológicos importantes en la diferenciación entre linfoma intestinal e IBD que se han tratado en el apartado anterior. Además, observan que el diagnóstico inicial de las biopsias teñidas con hematoxilina-eosina variaba al analizar los cristales de inmunohistoquímica, y podía, en algunos de los casos, variar de nuevo al estudiar los resultados de las técnicas de PCR, concluyendo la alta utilidad de ambos métodos (Kiupel y col., 2011).

Moore y colaboradores, en una publicación reciente, realizan un estudio amplio del linfoma gastrointestinal felino que incluye técnicas de PCR para detectar clonalidad linfocitaria. La técnica muestra una sensibilidad muy alta para los linfomas T, independientemente de la gravedad de las lesiones, detectándose monoclonalidad u oligoclonalidad en el 91% de los casos con rasgos morfológicos de linfoma T. En el caso de los linfomas B la sensibilidad fue, sin embargo, baja, de un 50%.

Hasta el momento parece que las técnicas inmunohistoquímicas y de PCR pueden suponer un apoyo complementario de gran valor para el diagnóstico diferencial de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal y el linfoma alimentario en el gato, aunque aún se necesitan estudios más amplios para confirmar su utilidad.

2.8.3.2 CLONALIDAD DE LINFOCITOS EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LINFOMA INTESTINAL E IBD EN LA ESPECIE CANINA

En la especie canina, se han utilizado técnicas de PCR para detectar la reorganización de receptores antigénicos, amplificando los genes del receptor antigénico gamma altamente variable de linfocitos T o el receptor de inmunoglobulinas de linfocitos B, para detectar la presencia poblaciones clonales de linfocitos. Vernau y colaboradores, en 1999, publican un estudio preliminar de clonalidad de linfocitos T en tres casos de leucemia linfocítica canina confirmados y cinco perros sanos, mediante PCR, a partir de ADN extraído de linfocitos de sangre periférica, con resultados prometedores (Vernau y col., 1999).

Burnett y colaboradores, en el año 2003, describen la técnica de PCR, a partir de ADN de tejidos, para clonalidad de linfocitos B y T, diseñando cebadores para la región CDR3 del gen que codifica el receptor gamma de células T (TCR γ) y del receptor de inmunoglobulinas de cadena pesada. La sensibilidad de las técnicas de PCR es del 91%, sin embargo, indican que ésta depende de la extensión de la enfermedad, la celularidad de la muestra y la representatividad de la muestra para la neoplasia, de manera que utilizada como herramienta clínica es posible que la sensibilidad fuese menor. Realizan, además, técnicas de citometría de flujo para el inmunofenotipo, encontrando correspondencia entre estos resultados y los de PCR en todos los casos menos en uno. Este estudio incluye muestras con un diagnóstico definitivo de linfoma, mieloma o leucemia, pero no mencionan que ninguno de los casos sea de un linfoma digestivo (Burnett y col., 2003). Más adelante, esta técnica se ha tratado de utilizar para la gradación de los linfomas multicéntricos, y como indicador pronóstico de los mismos, detectando la presencia de linfocitos tumorales en sangre circulante, y en ganglios linfáticos con infiltración tumoral, con los cebadores diseñados por Burnett y colaboradores (Burnett y col., 2003; Keller y col., 2004; Wilkerson y col., 2005; Lana y col., 2006; Valli y col., 2006). Otros autores diseñan nuevos cebadores para este tipo de estudios (Tamura y col., 2006; Yahihara y col., 2007; Gentilini y col., 2009). De cara a mejorar la

sensibilidad, se propone el análisis automatizado de fragmentos (GeneScanning), publicando un aumento en la sensibilidad hasta el 97,9%, en tejido congelado (Gentilini y col., 2009). Además, se realizan PCR heteroduplex para distinguir reacciones clonales de pseudoclonales, evitar falsos positivos, y determinar la fiabilidad de los resultados (Valli y col., 2006; Gentilini y col., 2009; Takanosu y col., 2010). Se han utilizado métodos de electroforesis capilar en gel con fluorescencia inducida por láser para los linfomas T, tratando de aumentar la rapidez de los test, con un mínimo consumo de muestra, y mejorando la sensibilidad y la resolución, con los mismos resultados que los geles de electroforesis en bloque tradicionales, en muestras de sangre (Jeon y col., 2007). Incluso se ha tratado de aumentar la sensibilidad utilizando PCR a tiempo real, con la desventaja de la necesidad de un aparataje específico y económicamente costoso (Yamazaki y col., 2008).

Recientemente el estudio de Kaneko y colaboradores sugiere la aplicación de estos métodos como herramienta diagnóstica en el linfoma alimentario canino. Extraen el ADN de tejido congelado de biopsias endoscópicas caninas de 78 perros con signos gastrointestinales. En este caso, todos los perros diagnosticados de linfoma alimentario resultaron positivos (monoclonales), pese a que sólo fueron cuatro casos; todos los casos de adenocarcinoma fueron negativos; pero, entre los 69 casos de enteritis de diversa naturaleza, seis resultaron positivos. En dos de ellos se sospecha que puedan ser casos de linfoma incipiente, tras realizar citologías por aspiración con aguja fina, pese a que el diagnóstico histológico de las biopsias era de enteritis; y de los cuatro restantes no existen datos de laparotomía o autopsia. Esto sugiere la utilidad de esta técnica en la detección de casos de linfoma latente que no puede ser diagnosticado histopatológicamente (Kaneko y col., 2009).

Los mismos autores realizan un estudio preliminar sobre la utilidad de estas técnicas en el diagnóstico diferencial entre IBD y linfoma intestinal en biopsias endoscópicas. Estudian 24 casos, que valoran dos patólogos diferentes, de los que uno diagnostica 19 linfomas y, el otro, 12 linfomas. Utilizan bloques de parafina para la extracción de ADN, los cebadores previamente diseñados (Burnett y col., 2003), las técnicas heterodúplex descritas (Valli y col., 2006), y geles de electroforesis de poliacrilamida. Realizan PCR en los 12 casos en los que existe consenso, concluyendo que la sensibilidad de la técnica para diagnosticar el linfoma alimentario es del 66,7%. Este porcentaje es menor que el hallado para otro tipo de linfomas (Burnett y col., 2003; Valli y col., 2006), lo que puede ser debido a la gravedad de la inflamación de tipo linfoplasmocitario

concomitante. Entre los otros doce casos existen resultados que corresponden o bien a falsos positivos, o bien que existía un diagnóstico histopatológico erróneo de enteritis. Por ello, los autores señalan la necesidad de realizar más estudios para determinar la especificidad de la técnica, y proponen que esta técnica se utilice como complemento al diagnóstico histopatológico, teniendo en cuenta que la técnica por sí sola puede llevar a un diagnóstico incorrecto (Fukushima y col., 2009).

Takanosu y colaboradores, en el año 2010, publican un estudio sobre clonalidad de linfocitos por PCR en el que incluyen biopsias endoscópicas de duodeno de perros con vómito crónico, y también tejido linfoide de perros con sintomatología de linfoma multicéntrico, congelando las muestras antes de la PCR. Realizan electroforesis en geles de poliacrilamida, comparando resultados en PCR normal, y después de una PCR heterodúplex. Casi todas las muestras de duodeno resultaron inicialmente monoclonales tanto para linfocitos B como para linfocitos T, incluso las que presentaban un diagnóstico histopatológico de enteritis linfoplasmocitaria, siendo las bandas de casos correspondientes a IBD y a linfoma intestinal del mismo tamaño. Sin embargo, después de realizar técnicas de PCR heterodúplex, las bandas en los casos que no presentaban procesos neoplásicos desaparecieron, quedando un total de cuatro muestras clonales. De esta manera se permitió la diferenciación procesos clonales y pseudoclonales. Se trata de un método asequible, que no necesita aparataje complementario, para aumentar la especificidad de la PCR convencional (Takanosu y col., 2010).

Un único trabajo estudia la clonalidad de las poblaciones linfocitarias de linfocitos T en casos de IBD canino, y tan solo uno de los 47 casos incluidos en el estudio resulta monoclonal, y no presenta respuesta al tratamiento en los seis meses de seguimiento clínico que se realiza (Olivero y col., 2011). Utilizan los mismos cebadores descritos para el linfoma canino (Burnett y col., 2003).

Un trabajo muy reciente describe la utilidad de las técnicas de clonalidad de linfocitos T por PCR para diferenciar el linfoma cutáneo de tipo T epiteliotrópico del eritema multiforme en cavidad oral en el perro (Nemec y col., 2012).

Como hemos comentado para la especie felina, los resultados existentes hasta el momento indican que las técnicas de PCR pueden constituir un método complementario a la histopatología de gran utilidad para el diagnóstico

diferencial de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal y el linfoma alimentario en el perro.

2.9 POBLACIONES LINFOCITARIAS

Los linfocitos son los responsables de la especificidad y capacidad de memoria de la respuesta inmunitaria de tipo adaptativo del organismo, ya que son capaces de diferenciar específicamente diversos determinantes antigénicos (Abbas y col., 2008).

La defensa del organismo frente a microorganismos tienen lugar a través de un respuesta inicial, la inmunidad innata (natural o espontánea), y posteriormente a cargo de la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa y sus componentes principales son: las barreras físicas y químicas; las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) y linfocitos NK (natural killer); las proteínas sanguíneas que forman parte del sistema de complemento y otros mediadores de inflamación; además de unas proteínas llamadas citocinas, que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células encargadas de la inmunidad innata.

La respuesta adaptativa, por su parte, es mucho más específica y tiene capacidad de “recuerdo” a exposiciones repetidas a un mismo antígeno, para responder con más efectividad. Los principales componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos de secreción, los anticuerpos. Existen dos tipos de inmunidad adaptativa, la inmunidad humoral (constituida por los anticuerpos que producen los linfocitos B) y la inmunidad celular (a cargo de los linfocitos T) (Abbas y col., 2008).

En los años 60 se describieron, utilizando técnicas especiales, varias poblaciones de linfocitos, que eran morfológicamente indiferenciables (Papermaster y col., 1962; Cooper y col., 1965). Los tres tipos principales son (Abbas y col., 2008):

- Linfocitos T: se encargan de la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa, así como de las respuestas de base celular.
- Linfocitos B: se encargan de la producción de anticuerpos, implicados en la respuesta inmunitaria adaptativa de tipo humoral. Cuando reconocen antígenos se diferencian en células plasmáticas, secretoras de anticuerpos.

- Linfocitos NK (natural killer): desarrollan un papel importante en la inmunidad innata.

Existen, además, varias subpoblaciones de linfocitos, en base a su desarrollo y a sus antecedentes de exposición a antígenos. Todos los linfocitos se generan a partir de células progenitoras de la médula ósea, que atraviesan una serie de fases de maduración que les llevan a expresar sus receptores antigénicos, así como diferentes moléculas de superficie, y a adquirir sus características funcionales para convertirse en células maduras efectoras de las funciones de la inmunidad adaptativa. Los linfocitos pasan, a grandes rasgos, por los órganos linfoides primarios (placas de Peyer para linfocitos B y el timo para los linfocitos T en el caso del perro), donde maduran parcialmente; y después se dirigen por vía circulatoria a los órganos linfoides secundarios, para poder finalizar el proceso de maduración (Tizard, 2009).

Entre las subpoblaciones de linfocitos T, desde el punto de vista funcional, cabe destacar los linfocitos T helper (T cooperadores) y los linfocitos T citotóxicos. Cuando se produce una estimulación antigénica los linfocitos T helper segregan citocinas, que actúan poniendo en marcha la proliferación y diferenciación de diversas células. Los linfocitos T citotóxicos son capaces de destruir células productoras de antígenos extraños. Encontramos también linfocitos T reguladores, que se encargan de inhibir las respuestas inmunitarias (Abbas, 2008).

A principios de los años 70 se descubrió que los linfocitos tenían antígenos de superficie o receptores que podían potencialmente utilizarse para identificar el linaje de los linfocitos tanto normales como neoplásicos (Shevach y col., 1973; Jaffe y col., 1977). Así, hoy en día, para diferenciar las subpoblaciones de linfocitos se hace necesario emplear diferentes moléculas de superficie a modo de marcador fenotípico. Se denomina inmunofenotipo al patrón de moléculas de superficie expresadas por los distintos linfocitos. A lo largo del tiempo, se han empleado diferentes anticuerpos frente a antígenos o marcadores de diferenciación linfocitaria para tratar de optimizar la identificación de las diferentes subpoblaciones. A estos marcadores linfocíticos se les denomina CDs ("cluster differentiation") o grupos de diferenciación. Cada CD se emplea para referirse a un marcador de superficie que identifica una estirpe particular o una fase de diferenciación. Este sistema, que en un principio se utilizó para denominar a los marcadores de linfocitos humanos, se emplea

actualmente también para las moléculas homólogas de otras especies, como la especie canina (Abbas y col., 2008).

Entre los antígenos linfocitarios disponibles para el inmunofenotipaje en medicina humana nos encontramos los siguientes (Robbins y col., 2010):

- Asociados principalmente a células T: CD1, CD3, CD4, CD5, CD8.
- Asociados principalmente a células B: CD10, CD19, CD20, CD21, CD23, CD79.
- Asociados principalmente a linfocitos NK: CD16, CD56
- Marcadores de linfocitos de activación reciente: CD30
- Presentes en todos los linfocitos: CD45. Está presente en todos los leucocitos y se conoce como antígeno común leucocitario.

Para la detección de estos marcadores se han utilizado diversas técnicas, como la citometría de flujo, o la inmunohistoquímica.

El marcador linfocitario CD3 está presente en todos los linfocitos T maduros, ya que se trata del conjunto de proteínas que forman parte del receptor de antígeno de estos linfocitos (TCR) y que están implicadas en la transmisión de la señal de activación desde el receptor hasta el interior celular tras la unión antigénica (Tizard, 2009). Ha sido el más utilizado en los linfomas caninos.

Por su parte, CD79, está compuesto por dos componentes, CD79a y CD79b, y constituye la porción encargada de la transducción de señales del receptor de las células B, abarcando las regiones transmembrana e intracitoplásmica de dicho receptor. Es un marcador de superficie que se expresa en todas las células B, tanto maduras como inmaduras y neoplásicas, y exclusivamente en ellas. Por ello, constituye un marcador muy útil para la diferenciación de linfomas de tipo B y T. En medicina humana se han utilizado mucho también para diferenciar la leucemia linfoblástica aguda de precursores-B, ya que este tipo de tumores son negativos a otros marcadores de células B como CD20 o CD45RA. (Chu y col., 2001). Se utilizó por primera vez para el linfoma canino por Milner y colaboradores en el año 1996, con buenos resultados (Milner y col., 1996).

El marcador CD20 es una fosfoproteína transmembrana que se expresa predominantemente en las células B, desde el estadio pre-B hasta las células B activadas (Harris, 2001). La secuenciación del gen CD20 en el perro ha revelado

una secuencia de aminoácidos que presenta una similitud del 73 y el 68% con el humano y el de ratón respectivamente (Kano y col, 2005). En el perro se ha detectado mediante técnicas inmunohistoquímicas, tanto en linfocitos B normales como en linfomas (Jubala y col., 2005). Sin embargo, en los plasmocitomas caninos se ha encontrado una positividad a CD20 en torno al 20% (Ramos-Vara y col., 2007).

En la mucosa sana de intestino delgado es más frecuente que los linfocitos T (CD3+) se encuentren en mayor número en la lámina propia de las vellosidades, que en zonas más profundas, adyacentes a las criptas. Esto ocurre tanto en las subpoblaciones CD4+ como en las CD8+. Las células plasmáticas (células B), aparecen en las dos localizaciones, y algunas de ellas (IgA+ e IgM+) son más frecuentes en la zona profunda de la lámina propia, cerca de la base de las criptas (German y col., 1999; Sonea y col., 2000; Waly y col., 2001).

2.9.1 MARCADORES LINFOCITARIOS UTILIZADOS EN LOS LINFOMAS CANINOS Y FELINOS

La detección inmunohistoquímica de marcadores linfocitarios es una práctica establecida para la determinación del inmunofenotipo de los linfomas caninos y felinos. Teske realizó, en el año 1974, un estudio muy completo en el linfoma multicéntrico canino, que incluía, como marcadores de células T, CD4 y CD8; y para células B, CD21, anti-IgM, anti-IgD y anti-IgG, entre otros (Teske y col., 1974).

Actualmente, se cree que en los linfomas gastrointestinales es más frecuente el inmunofenotipo T que el inmunofenotipo B, tanto en el perro (Miura y col., 2004; Coyle y col., 2004; Ozaki y col., 2006; Frank y col., 2007; Rassnick y col., 2009) como en el gato (Zwahlen y col., 1998; Briscoe y col., 2011; Kiupel y col., 2011; Moore y col., 2012), aunque en el gato hay estudios contradictorios (Waly y col., 2005; Pohlman y col., 2009). En medicina humana, por el contrario, el linfoma gastrointestinal es más frecuente de tipo B que de tipo T (Kohno y col., 2003; Yang y col., 2004; Radic-Kristo y col., 2010; Arora y col., 2011; Kim y col., 2011), al igual que ocurre con el linfoma multicéntrico canino (Teske y col., 1994; Ruslander y col., 1997; Fournel-Fleury y col., 2002; Sueiro y col., 2004; Sokolowska y col., 2005; Sözmen y col., 2005; Guija de Arespacochaga y col.,

2007; Keller y col., 2007; Gavazza y col., 2008; Vezzali y col., 2009; Ponce y col., 2010).

En la especie felina diversos investigadores utilizan principalmente los marcadores linfocitarios CD3 para linfocitos T, y CD79a o CD20 para linfocitos B. Kiupel y colaboradores (2011) encuentran un total de 37 casos de linfoma tipo T, frente a 7 de tipo B en su estudio retrospectivo del linfoma digestivo felino. Briscoe y colaboradores (2011) encuentran 28 de 29 casos de linfoma intestinal de bajo grado de tipo T, y tan solo uno de tipo B. Recientemente, Moore y colaboradores realizan un estudio muy amplio del linfoma gastrointestinal felino, utilizando inmunohistoquímica para CD3 y CD79, y describen un 83% de linfomas gastrointestinales de tipo T en esta especie (Moore y col., 2012). Otros autores encuentran también el linfoma T más frecuente que el B en el tracto gastrointestinal (Zwahlen y col., 1998; Cesari y col., 2009). Sin embargo, Waly y col. (2005) encuentran una mayoría de linfomas alimentarios de tipo B en la especie felina, con un ratio 15/8. Pohlman y colaboradores, en el año 2009, describen un predominio de linfomas gastrointestinales de tipo B, sin embargo, esto puede ser debido a que todos los linfomas gástricos que encuentran son de tipo B, mientras que de los linfomas intestinales, el 52% son de inmunofenotipo T (Pohlman y col., 2009).

En la especie canina se ha estudiado menos el linfoma gastrointestinal que en la felina, ya que es menos frecuente. Coyle y col. (2004) realizan un estudio retrospectivo de linfoma gastrointestinal bastante amplio, utilizando los marcadores linfocitarios CD20 y CD3, con técnicas inmunohistoquímicas aplicadas a 44 casos, de los que el 75% eran de tipo T. Ozaki y colaboradores (2006) utilizan técnicas inmunohistoquímicas con los marcadores CD3 y CD79a para el linfoma T intestinal, los mismos marcadores que son utilizados por otros autores para otro tipo de linfomas caninos (Milner y col., 1996; Sueiro y col., 2004; Sokolowska y col., 2005; Keller y col., 2007; Lurie y col., 2008; Vezzali y col., 2010; Valli y col., 2011; Ponce y col., 2010).

Algunos autores han utilizado los marcadores leucocitarios para linfocitos T, linfocitos B y células plasmáticas (CD3, CD4, CD79a, IgA, IgG, IgM) en biopsias de perros con IBD, utilizando técnicas inmunohistoquímicas. La mayoría comparan biopsias de perros con IBD con biopsias de perros sanos, describiendo un aumento en las dos poblaciones linfocitarias en los casos de IBD (German et al., 2001; Kleinschmidt et al., 2007; Stonehewer et al., 1998).

2.10 LA PROLIFERACIÓN CELULAR: Ki-67

La proliferación y diferenciación celular son esenciales para la formación, reparación y mantenimiento de la adecuada funcionalidad de todos los tejidos y órganos. Todas las células de un organismo multicelular están sometidas a un riguroso control dentro de su ciclo vital. Este control abarca tanto su potencial de proliferación y diferenciación como la muerte celular por senescencia o apoptosis (Vaux y col., 1999).

En las neoplasias lo que ocurre es que se altera la proliferación celular, por alteraciones en algunos de los puntos de control del ciclo celular donde intervienen los genes supresores tumorales. Esto provoca en la célula una capacidad proliferativa aparentemente ilimitada, que es la característica más importante que diferencia a las células tumorales de sus homólogas normales (Weinberg, 1996).

El ciclo celular es la secuencia cíclica de procesos complejos que culminan en la mitosis, dando lugar a dos células hijas (Perona, 1998; Schafer, 1998). En general, todas las células pasan por dos períodos en el curso de su ciclo celular: uno de interfase, que es el período durante el cual la célula crece, replica su ADN y se prepara para la siguiente división; y un período de división o fase M. El período de interfase se divide en varias fases, que se denominan fases G₁, S y G₂. El período de latencia se denomina G₀ (Vaux y col., 1999; Perona, 1998; Schafer, 1998).



Figura 1. Esquema del ciclo celular.

La forma clásica de calcular el índice de proliferación es el conteo de mitosis en distintos campos del tumor. Normalmente se cuenta el número de mitosis en un cierto número (habitualmente diez) de campos consecutivos a un

objetivo determinado (que suele ser 40x). No obstante, aunque parece bastante objetivo, existen un considerable número de factores que pueden variar el resultado, tales como el grosor de la muestra, los campos elegidos, el tipo de microscopio usado, un retraso en el tiempo de fijación y la variabilidad del observador en la identificación de figuras mitóticas (Haapasalo y col., 1989).

La proliferación celular también puede ser determinada por técnicas más objetivas, mediante el marcaje inmunohistoquímico de antígenos nucleares relacionados con el crecimiento y la división celular, como el antígeno nuclear Ki-67 (Kelleger y col., 1994; Mukaratirwa, 2005).

El antígeno nuclear Ki-67 es una proteína que se localiza en el núcleo de la célula y está relacionada con el ciclo celular. Se expresa en las fases G₁, S, G₂ y M pero no en la fase de latencia G₀ (Brown y col., 1990; Gerdes y col., 1984). Ki-67 es una proteína con una vida media corta, ya que se degrada después de la mitosis de la célula (Schafer, 1998; McEntee y col., 2002).

Existen anticuerpos monoclonales frente a Ki-67 (MIB-1, o SP6) que detectan epítomos resistentes al formol y, por tanto, son buenos marcadores inmunohistoquímicos de Ki-67 en tejidos fijados, y pueden utilizarse en el marcaje de neoplasias (Mukaratirwa, 2005).

2.10.1. KI-67 EN MEDICINA HUMANA

En distintas neoplasias humanas se ha relacionado la expresión de Ki-67 con un peor pronóstico. Es así, por ejemplo, en el carcinoma mamario (Moore y col., 1995; Choi y col., 2005), carcinoma pulmonar (Murray y col., 1992; Martin y col., 2004) o en el carcinoma hepático (Murray y col., 1993; Cui y col., 2004), en los que se ha descrito una relación entre la expresión de Ki-67 y el peor pronóstico de la enfermedad.

En cuanto a las neoplasias gastrointestinales, se ha tratado de relacionar la expresión de Ki-67 con el pronóstico de los carcinomas gástricos, obteniéndose resultados contradictorios. Hay autores que relacionan un mayor índice Ki-67 con carcinomas en estado avanzado (Igarashi y col., 1999; Li y col., 2009), mientras que otros no encuentran ninguna relación entre la expresión de

Ki-67 y el pronóstico en los carcinomas gástricos (Liu y col., 2001; Lazar y col., 2010; Giaginis y col., 2011).

En cuanto a los linfomas, existen numerosos estudios que relacionan la expresión de Ki-67 con el pronóstico de linfomas de distintas localizaciones, entre ellas el tracto gastrointestinal (Broide y col., 2009; Krugmann y col., 2001). Broide y colaboradores (2009), estudian 268 pacientes con linfoma no-Hodking's encontrando una expresión media de Ki-67 de un 26.6% en linfomas de bajo grado y de 97.6% en linfomas muy agresivos, porcentajes similares a los obtenidos en un estudio previo de linfomas tipo MALT (Rivas y col., 1992). Sugieren que la expresión de Ki-67 varía según el tipo de linfoma, y que este índice podría utilizarse para diferenciar entre las formas indolente (linfoma MALT, linfoma linfocítico de células pequeñas y linfoma linfoplasmacítico) y agresiva de la enfermedad, e incluso ser un marcador de pronóstico, combinado con otros factores, especialmente en el linfoma B de células grandes. De este trabajo se deduce un posible valor del índice de proliferación Ki-67 tanto en el diagnóstico como en el pronóstico de los linfomas no-Hodking's.

Además del valor pronóstico de Ki-67, que ha sido demostrado en diversas neoplasias, en medicina humana este marcador ha sido utilizado como herramienta diagnóstica en la evaluación de desórdenes linfoproliferativos (Bryant y col., 2006; Lukande y col., 2008). Bryant y colaboradores estudian 149 casos con lesiones benignas y malignas en diversas localizaciones, entre ellas el tracto gastrointestinal. Estudian tanto el índice de proliferación como la distribución de las células positivas a Ki-67, demostrando la capacidad de Ki-67 para diferenciar lesiones proliferativas benignas y malignas en el tejido linfoide, especialmente en aquellas en las que predomina un patrón folicular. Utilizan biopsias de ganglios linfáticos, por ello entre sus grupos de estudio no contemplan el IBD (Bryant y col., 2006).

En cuanto a la enfermedad inflamatoria crónica intestinal, que en el hombre tiene dos formas, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Existe un trabajo que estudia la distribución de los linfocitos T (positivos a CD3) en fase de proliferación (positivos a Ki-67) en la mucosa intestinal. Estudian un total de 19 casos de enfermedad de Crohn, 7 casos de colitis ulcerosa, y 12 casos control de tejido normal. Observan que no existen prácticamente células linfoides positivas a Ki-67 en la lámina propia de íleon y colon, ni en los tejidos control sanos, ni en las muestras de enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Sin embargo, observan más células positivas en los folículos linfoides de íleon y

colon de los pacientes con enfermedad de Crohn que en los pacientes con colitis ulcerosa y en los controles (Fell y col., 1996).

2.10.2 KI-67 Y LAS NEOPLASIAS CANINAS

En la especie canina, Ki-67 se ha utilizado tanto como marcador para establecer un diagnóstico como para establecer el pronóstico de neoplasias de diversas localizaciones.

Se han publicado varios trabajos que encuentran relación entre el índice de proliferación celular Ki-67, la malignidad histológica y el pronóstico de tumores de diferentes localizaciones, tales como neoplasias hepáticas (Neumann y col., 2005), tumores corticales adrenales (Labelle y col., 2004), melanomas orales (Laprie y col., 2001; Millanta, 2002), mastocitomas cutáneos (Abadie y col., 1999) y otros (Mukaratirwa, 2005). En las neoplasias mamarias caninas Ki-67 ha sido muy estudiado, describiéndose que un alto índice Ki-67 se correlaciona positivamente con un incremento en el riesgo de metástasis, un menor tiempo de supervivencia sin sintomatología, y una menor tasa de supervivencia total (Peña y col., 1998; Nieto y col., 2000; Sarli y col., 2002; Zuccari y col., 2004).

En cuanto al potencial valor diagnóstico de Ki-67, determinado con inmunohistoquímica, se ha utilizado para diferenciar el acantoma queratinizante del carcinoma de células escamosas en piel (Della Salda y col., 2002), o el histiocitoma cutáneo del tumor venéreo transmisible (Guvenç y col., 2002). Igualmente, se ha utilizado en los tumores mamarios caninos para distinguir los benignos de los malignos, encontrándose en estos últimos un índice mayor que en los benignos (Lee y col., 2004). Sin embargo, un estudio no encuentra valor diagnóstico en el índice Ki-67 para diferenciar seminomas de tumores intersticiales y de células de Sertoli (Sarli y col., 1994).

En el intestino canino, la expresión de Ki-67 en la mucosa sana se limita a la zona profunda de las criptas de Lieberkühn, que es la zona proliferativa del epitelio (Laprie y col., 1998; Baum y col., 2007).

En cuanto a las neoplasias gastrointestinales, Mukaratirwa y colaboradores (2004) estudiaron el índice de proliferación Ki-67 en neoplasias epiteliales gastrointestinales caninas. Concluyeron que los adenomas

intestinales, en general, expresaban un menor índice de Ki-67 que los carcinomas intestinales. En los adenomas no había diferencias significativas según el tipo histológico. Por el contrario, en los carcinomas, los tipos indiferenciados tanto de estómago como de intestino eran fuertemente positivos frente a Ki-67, mientras que los carcinomas diferenciados presentaban una expresión más variable. Se encontró que la expresión de esta proteína era mayor en los márgenes del tumor, así como en los carcinomas que presentaban invasión linfática, aunque no se encontró una relación entre el índice de proliferación celular Ki-67 y el grado de infiltración del tumor.

2.10.3 EXPRESIÓN DE KI-67 EN EL LINFOMA CANINO

Existen varios trabajos que reflejan la expresión de Ki-67 en el linfoma multicéntrico canino, evaluando su posible valor pronóstico (Fournel-Fleury y col., 1997; Kiupel y col., 1999; Phillips y col., 2000; Ponce y col., 2003; Keller y col., 2007).

Kiupel y colaboradores (1999) estudian varios factores que podrían estar relacionados con el pronóstico en linfomas multicéntricos caninos, encontrando una diferencia significativa en la supervivencia total sólo entre los linfomas con menos del 20% de células positivas frente a la proteína Ki-67 y los perros que presentaron entre el 40 y el 60% de células positivas, pero no en el resto de grupos que establecen, por lo que no lo consideran un valor pronóstico significativo.

Un estudio de la proteína Ki-67 en 92 perros con linfoma multicéntrico reveló un índice menor del 21% en los linfomas de bajo grado de malignidad, y mayor de un 21% en los linfomas de alto grado según la clasificación de Kiel, sugiriendo una posible aplicación de este índice en la clasificación de los linfomas (Fournel-Fleury y col., 1997). Otro trabajo realizado en 9 casos de linfoma multicéntrico en la especie canina, todos ellos de inmunofenotipo T, de alto grado, presentaban una expresión de Ki-67 media de 65,7%, con un rango del 50 al 82% (Ponce y col., 2003). Flood-Knapik y colaboradores encuentran expresiones de Ki-67 muy variables, entre el 5,2 y el 85,5%, que difieren ampliamente para los distintos tipos de linfoma indolente según la clasificación de la OMS (Flood-Knapik y col., 2012).

Phillips y colaboradores (2000) estudian 40 casos de linfoma multicéntrico, en los que encuentran una correlación positiva entre un elevado índice Ki-67 en los linfocitos tumorales y un tiempo de recidiva más prolongado después del primer protocolo quimioterápico, aunque no encuentran relación con la supervivencia total. Esto lo explican debido a la sensibilidad más alta a la quimioterapia al iniciar el tratamiento de los tumores más proliferativos; aunque no mencionan porcentajes concretos de expresión de Ki-67, sino simplemente su aumento o disminución. Zacchetti y colaboradores describen una expresión media de Ki-67 de 22,1% en el linfoma canino (Zacchetti y col., 2003).

En el linfoma alimentario canino, un único trabajo realiza inmunohistoquímica para el índice de proliferación celular Ki-67 en once linfomas T-intestinales, encontrando expresiones entre el 3,5 y el 52,6%, con una media del $17,7 \pm 18,6\%$ (Ozaki y col., 2006). Además, se ha publicado un caso de linfoma digestivo canino en un perro de un año de edad con un 43,5% de células positivas frente a Ki-67 (Kodama y col., 2009). Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún trabajo que evalúe la expresión de Ki-67 específicamente en los linfomas alimentarios caninos comparándolos con la enfermedad inflamatoria crónica intestinal, como herramienta para el diagnóstico diferencial entre ambas patologías.

2.11 PRONÓSTICO DEL IBD Y DEL LINFOMA CANINO

Como hemos visto, IBD y linfoma intestinal canino son dos enfermedades que pueden compartir una serie de rasgos comunes, pero que presentan un tratamiento y un pronóstico distinto (Guildford y col., 1996; Leibman y col., 2003). Pese a que no es el objetivo de este trabajo, vamos a realzar una breve reseña del pronóstico de estas patologías.

Cuando hablamos del pronóstico de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal canina hemos de tener en cuenta de que se trata de una enfermedad que no tiene cura; pero, a pesar de eso, en la mayoría de los casos el pronóstico es favorable, ya que se consigue una mejoría de los signos clínicos. El tratamiento, médico y dietético, debe mantenerse durante largos períodos de tiempo, o incluso de por vida (Guildford y col., 1996; Marks, 1998; Craven y col., 2004). Entre los factores que pueden influir en el pronóstico de esta enfermedad se encuentran la gravedad del infiltrado, la condición corporal del animal, la necesidad de un tratamiento inmunosupresor, la hipoalbuminemia o el índice de actividad (Willard, 2003; Craven y col., 2004; Münster y col., 2006).

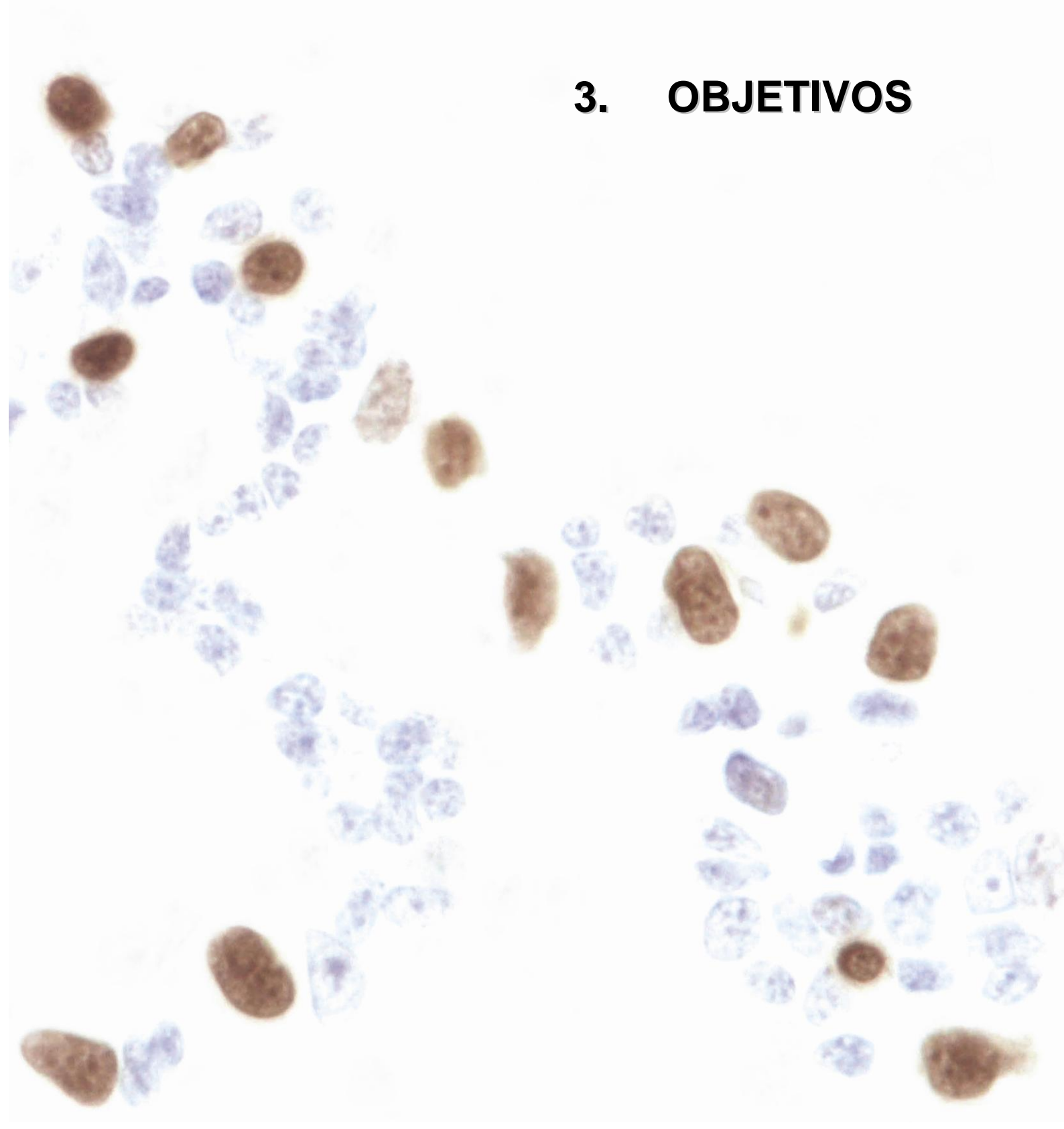
En el caso del linfoma canino, el tratamiento es, en todos los casos, con fármacos quimioterápicos, bien utilizando un único fármaco, o bien combinados, existiendo varios protocolos estandarizados. El linfoma digestivo puede tratarse mediante resección quirúrgica si aparece en forma de masa única, siempre seguido de quimioterapia adyuvante postquirúrgica. La supervivencia total en perros con linfosarcoma oscila entre los 6 y los 12 meses, aunque se han publicado supervivencias mayores de 14 meses (Keller y col., 1993; Vail y col., 2001; Hall y col., 2007). Se considera que el linfoma alimentario es más refractario al tratamiento que el linfoma multicéntrico. Morrison-Collister y colaboradores (2003) encuentran una supervivencia media de 77 días en 10 perros con linfoma gastrointestinal, mientras que esta supervivencia es de 302 días de media en 94 perros con linfoma multicéntrico. Otro estudio utiliza el mismo protocolo quimioterápico en el linfoma gastrointestinal, con tiempos de supervivencia parecidos (Rassnick y col., 2009).

Tienen mejor respuesta a la quimioterapia los linfomas en forma de masa solitaria en el tracto digestivo que los que afectan de forma difusa a la pared

gastrointestinal (Tams, 2003). La mayoría de la literatura disponible para el linfoma canino se refiere al linfoma multicéntrico, o bien no hace distinción en cuanto a la localización anatómica del tumor. Existen muy pocos trabajos que hablen de tratamiento y pronóstico del linfoma digestivo canino. Couto y colaboradores publicaron un período de supervivencia muy corto, de 3 a 14 semanas tras el diagnóstico (Couto y col., 1989). Frank y colaboradores realizan un estudio clínico en 30 casos de linfoma gastrointestinal canino, aplicando tratamiento quirúrgico solamente a 4 casos, cirugía combinada con quimioterapia a 8 casos, quimioterapia sola a 15 casos, o sólo tratamiento paliativo a 3 casos. Los protocolos quimioterápicos de este estudio no son iguales para todos los pacientes, siendo algunos con un fármaco único y otros combinados. La supervivencia media general fue de 13 días, aunque para los linfomas localizados en intestino delgado la supervivencia media alcanzó los 61 días. Se trata de un pronóstico muy pobre, que quizá puede atribuirse al alto número de linfomas de tipo T que encontramos entre los linfomas gastrointestinales.

Se considera que afectan negativamente al pronóstico de los perros con linfoma la presencia de signos sistémicos (subestadío B de la clasificación TNM de la OMS), hipercalcemia, afectación de ganglios mediastínicos, e inmunofenotipo T. La utilización de la clasificación histopatológica como factor pronóstico presenta resultados inconsistentes. La edad y la raza no afectan a la duración de la remisión, ni de la supervivencia, y la mayoría de estudios tampoco encuentran relación entre el estadio clínico y el pronóstico, exceptuando los perros con linfomas en estadio V (según la clasificación de la OMS) evidente (Hall y col., 2007). Los dos factores más correlacionados con el pronóstico son el inmunofenotipo y el subestadío de la clasificación de la OMS. Actualmente se sabe que el inmunofenotipo tiene valor predictivo en los perros con linfoma, tanto multicéntrico como digestivo, presentando peor pronóstico los linfomas derivados de células T (inmunorreactivos a CD3), con remisiones y esperanzas de vida significativamente más cortas (Greenlee y col., 1990; Teske y col., 1994; Kiupel y col., 1999; Phillips y col., 2000; Dobson y col., 2001; Searcey, 2001; Ponce y col., 2004; Hall y col., 2007). De igual manera los perros que presentan subestadío B (clínicamente enfermos) presentan también un peor pronóstico que los de subestadío A (Vail y col., 2007). Hay autores que encuentran tiempos de remisión más cortos después del tratamiento con quimioterapia en perros con hipoalbuminemia respecto a perros con niveles de albúmina normales, aunque esta asociación no está clara (Price y col., 1991).

3. OBJETIVOS



El linfoma intestinal canino y la enfermedad inflamatoria crónica intestinal (IBD) son enfermedades relevantes en el perro, ya que son responsables de gran parte de los cuadros de vómito crónico y/o diarrea crónica en esta especie.

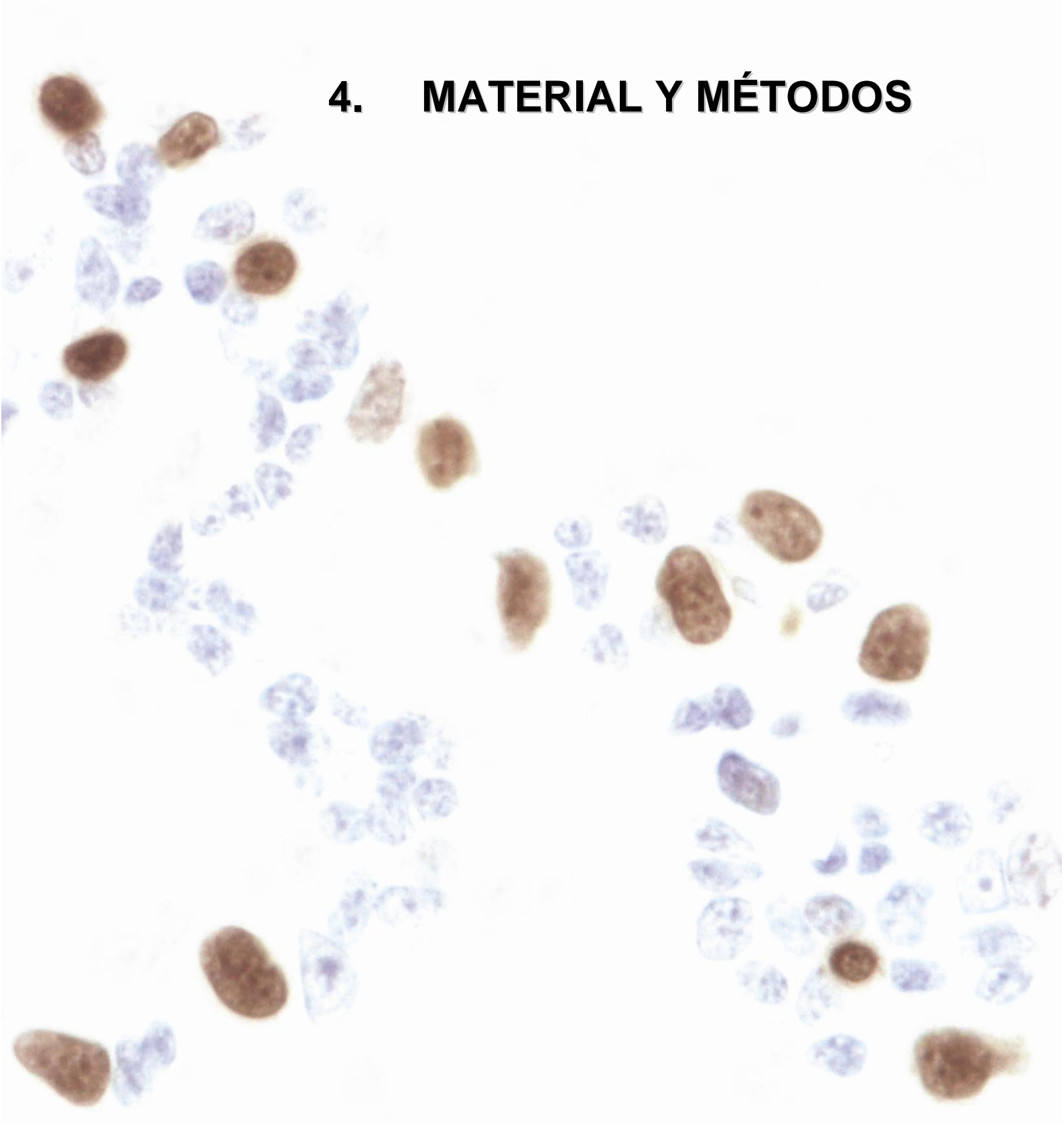
Como ya se ha comentado a lo largo de este trabajo, muchas veces estas enfermedades comparten presentación clínica y aspecto endoscópico. Para el diagnóstico de ambas enfermedades se sigue un protocolo diagnóstico muy similar, de manera que su diagnóstico diferencial se basa en el estudio histológico de las biopsias intestinales. Se trata de dos enfermedades con un tratamiento y un pronóstico diferentes, lo que hace necesaria su diferenciación. Sin embargo, numerosos trabajos realizados hasta el momento, ponen de manifiesto la dificultad en la interpretación correcta de las lesiones histológicas en un gran número de casos, especialmente cuando se pretende diferenciar entre una enfermedad inflamatoria crónica intestinal grave y un linfoma intestinal difuso en biopsias obtenidas mediante endoscopia.

Por todo esto, en el presente trabajo nos planteamos, como objetivo fundamental, caracterizar estas dos enfermedades y establecer criterios que nos permitan diferenciar un paciente con un IBD grave de un paciente con un linfoma intestinal. Para la consecución de este objetivo primordial, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Comparar la presentación clínica de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal grave y el linfoma intestinal canino, en cuanto a motivo de consulta, sintomatología completa, y resultados de las pruebas diagnósticas incluidas en el protocolo.
- Estudiar los parámetros endoscópicos establecidos por el grupo de trabajo de gastroenterología de pequeños animales de la WSAVA (Day y col., 2008) referentes a intestino delgado, además de la consistencia de la mucosa a la toma de biopsia, en ambas enfermedades.
- Caracterizar y valorar histológicamente las biopsias endoscópicas intestinales de ambas enfermedades mediante el estudio de una serie de parámetros que nos puedan orientar en el diagnóstico diferencial de los desórdenes linfoproliferativos.

- Estudiar el inmunofenotipo de las poblaciones linfocitarias implicadas en ambas enfermedades, mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas, con los marcadores linfocitarios CD3 y CD20, y valorar los linfocitos intraepiteliales positivos a CD3.
- Establecer, mediante técnicas inmunohistoquímicas, el índice de proliferación celular Ki-67 de ambas enfermedades (IBD vs linfoma intestinal), y estudiar posibles diferencias.
- Detectar, por medio de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la clonalidad linfocitaria de las muestras incluidas en el estudio, para establecer, junto con el resto de pruebas, un diagnóstico definitivo de las lesiones.
- Realizar una nueva clasificación de los linfomas intestinales caninos en función de los resultados obtenidos en el estudio histológico, inmunohistoquímico y con PCR, y considerando los nuevos criterios establecidos en la clasificación de la OMS para linfomas humanos.
- Establecer un gráfico secuencial, mediante las diferentes pruebas utilizadas en este trabajo, para facilitar el diagnóstico y el manejo clínico de estos pacientes.

4. MATERIAL Y MÉTODOS



4.1 ANIMALES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Se han incluido un total de 32 animales en este estudio. Todos ellos acudieron a la consulta de la especialidad de Gastroenterología y Endoscopia de pequeños animales del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid entre enero de 1999 y junio de 2011, con sintomatología digestiva de al menos tres semanas de duración. Tras un protocolo diagnóstico completo, se les realizó una endoscopia digestiva superior con toma de biopsias, que fueron remitidas al Servicio de Histología y Anatomía Patológica del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense.

Los criterios de inclusión de los animales en este estudio fueron:

- Presentar signos digestivos crónicos graves, con sintomatología compatible con enfermedad de tracto digestivo superior.
- Presentar unos resultados dentro de la normalidad en las pruebas del protocolo diagnóstico, considerándose necesaria la toma de biopsias.
- Un estudio histopatológico que reveló un diagnóstico presuntivo de IBD grave o de linfoma intestinal.

Los 32 perros se dividieron en tres grupos de diagnóstico después de estudiar las biopsias con las tinciones histológicas habituales y realizadas las técnicas inmunohistoquímicas para los marcadores linfocitarios CD3 y CD20, Los grupos son los siguientes:

- **Grupo IBD:** perros diagnosticados de una enfermedad inflamatoria crónica intestinal (IBD) de carácter grave (n = 15)
- **Grupo Linfoma:** perros diagnosticados de linfoma intestinal (n = 8).
- **Grupo DLP:** perros con un diagnóstico de desorden linfoproliferativo (DLP) no caracterizable mediante técnicas rutinarias, sospecha de linfoma (n = 9).

Los datos epidemiológicos de los 32 perros se incluyen en las tablas 1, 2 y 3, según el grupo al que pertenecen.

GRUPO IBD				
CASO	EDAD	SEXO	RAZA	PESO (Kg)
1	11	Hembra	Bóxer	24,2
3	5	Macho	Mastín Español	4
10	4	Macho	Rottweiler	43,3
11	2	Macho	Yorkshire Terrier	2,4
12	6	Hembra	Rottweiler	31
13	9	Macho	Cocker	17,1
14	8	Hembra	Mestizo	3,6
15	5,5	Macho	Mestizo	4,5
17	11	Macho	Cocker	16,4
18	3	Macho	Bichón Maltés	3,2
19	9	Macho	Labrador Retriever	31,1
20	2	Hembra	Beagle	12,9
27	9	Macho	Fox Terrier	14,8
29	11	Hembra	Mestizo	28,3
32	12	Macho	Rottweiler	36,4

Tabla 1. Datos epidemiológicos de los perros incluidos en el grupo IBD.

GRUPO LINFOMA				
CASO	EDAD	SEXO	RAZA	PESO
4	8	Macho	Bóxer	24,2
5	5	Hembra	Yorkshire Terrier	4,5
6	10	Macho	Mestizo	25,5
7	7	Hembra	Gos D'atura	14
8	11	Macho	Chow Chow	22,1
9	5	Hembra	Mestizo	30
23	8,5	Macho	Beagle	17,9
31	6	Macho	Golden Retriever	24

Tabla 2. Datos epidemiológicos de los perros incluidos en el grupo Linfoma.

GRUPO DLP				
CASO	EDAD	SEXO	RAZA	PESO
2	4	Hembra	Mastín Español	60
16	11	Macho	Rottweiler	34,8
21	8	Hembra	Yorkshire Terrier	2,3
22	14	Macho	Gos D'atura	15
24	9	Macho	Rottweiler	50
25	7	Hembra	Cocker	12
26	7	Macho	Pastor Alemán	26,2
28	10	Hembra	Mestizo	25,9
30	7	Macho	Bóxer	33,7

Tabla 3. Datos epidemiológicos de los perros incluidos en el grupo DLP.

4.2 PROTOCOLO DIAGNÓSTICO

En todos los casos se siguió un protocolo diagnóstico, basado en:

- Anamnesis
- Exploración física
- Índice de actividad clínica
- Analítica sanguínea
- Análisis coprológico seriado en busca de parásitos
- Pruebas de maldigestión
- Ecografía abdominal
- Exploración endoscópica y toma de biopsia

4.2.1 ANAMNESIS

Durante la anamnesis se realizaron una serie de preguntas a los propietarios, con el fin de recoger la máxima información posible del cuadro clínico del animal. Destacamos los siguientes aspectos:

- Motivo de consulta.
- Presencia de vómitos (frecuencia, contenido, momento de aparición).
- Pérdida de peso.
- Presencia de diarrea (continua o intermitente, frecuencia).
- Características de las heces: consistencia, color, volumen, presencia de sangre, moco o restos de alimento sin digerir, esteatorrea.
- Características de la defecación: número de deposiciones diarias, presencia de tenesmo, disquecia o urgencia.
- Presencia de borborismos intestinales o flatulencias aumentadas.
- Ataques de dolor abdominal (frecuencia, duración, recuperación, características, asociación con diarreas o vómitos).
- Dieta del animal: tipo de alimentación (pienso de alta o baja gama, comida húmeda, comida casera, comida humana, picoteo, etc.) y número de ingestas al día, así como la tendencia a comer hierba, huesos o cuerpos extraños.
- Apetito: normal, aumentado, disminuido, anorexia.

- Grado de actividad o actitud.
- Vacunaciones y desparasitaciones.
- Tratamientos recibidos y respuesta a los mismos.

4.2.2 EXPLORACIÓN FÍSICA

Se llevó a cabo una exploración física completa de todos los animales para detectar posibles alteraciones, en la que se valoró fundamentalmente:

- Exploración de mucosas y tiempo de relleno capilar.
- Exploración de ganglios submandibulares, preescapulares y poplíteos.
- Valoración de la condición corporal.
- Valoración del grado de hidratación.
- Auscultación cardíaca y pulmonar.
- Toma de temperatura rectal.
- Palpación abdominal: detección de masas, organomegalias, presencia de dolor, contenido anormal de las asas intestinales.

4.2.3 ÍNDICE DE ACTIVIDAD CLÍNICA

Se ha establecido un índice de actividad clínico para cada caso, de los grupos IBD, Linfoma y DLP, basándonos en los índices publicados para la enfermedad inflamatoria crónica intestinal (Jergens y col., 2004; Rodríguez-Franco y col., 2004; Allenspach y col., 2007). Estos índices se han adaptado, teniendo en cuenta que contamos con un grupo heterogéneo de pacientes, que no todos tendrán un diagnóstico final de enfermedad inflamatoria crónica intestinal, y que la finalidad del estudio es la comparación entre los tres grupos de estudio. En todos los casos, se ha valorado la actividad clínica de la enfermedad antes de la exploración endoscópica. Para calcular este índice hemos valorado de la siguiente manera los signos clínicos:

➤ Actividad/actitud:

- 0 = normal
- 1 = ligeramente disminuida
- 2 = moderadamente disminuida
- 3 = gravemente disminuida

- **Apetito:**
 - 0 = normal
 - 1 = ligeramente aumentado o disminuido
 - 2 = moderadamente aumentado o disminuido
 - 3 = gravemente aumentado o disminuido
- **Vómitos**
 - 0 = ninguno
 - 1 = aproximadamente un vómito por semana
 - 2 = 2-3 vómitos por semana
 - 3 = más de tres vómitos por semana
- **Diarrea**
 - 0 = ausencia de diarrea
 - 1 = diarrea con una frecuencia de hasta 2-3 deposiciones al día
 - 2 = diarrea con una frecuencia de 4-5 deposiciones al día y/o heces muy blandas
 - 3 = diarrea de más de 5 deposiciones al día y/o heces líquidas
- **Pérdida de peso**
 - 0 = no hay pérdida de peso
 - 1 = pérdida de peso ligera (< 5%)
 - 2 = pérdida de peso moderada (5 – 10%)
 - 3 = pérdida de peso grave (> 10%)

Las puntuaciones para cada uno de estos signos clínicos se han sumado, obteniéndose un índice que ha permitido realizar un estudio estadístico comparativo entre los tres grupos de estudio, así como buscar asociaciones con otros parámetros.

4.2.4 ANALÍTICA SANGUÍNEA

Se realizó una hematología y una bioquímica sanguínea, con el fin de descartar la presencia de enfermedades sistémicas y de detectar posibles alteraciones.

La extracción de sangre se realizó mediante punción de la vena cefálica o de la yugular, según el tamaño y el carácter del perro. La sangre obtenida se introdujo en tubos tratados con anticoagulante: E.D.T.A. (tetra-acetato de

etilenediamida) para la hematología, y heparina para la bioquímica. La sangre fue remitida para su análisis al Laboratorio de Biopatología Clínica del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid. En todos los perros se evaluaron los siguientes parámetros:

- Parámetros hematológicos: hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos y recuento de glóbulos blancos con fórmula leucocitaria. La cuantificación de estos parámetros se realizó de forma automática mediante un contador celular (modelo Advia® 120, Siemens Healthcare Diagnostics).
- Parámetros bioquímicos: urea, creatinina, proteínas totales, albúmina y ALT (GPT). Las proteínas se determinaron mediante refractometría y la albúmina mediante técnicas de química líquida. El resto de parámetros fueron determinados mediante técnicas de espectrofotometría de reflexión (Reflotron®).

Los valores de referencia para la especie canina de la hematología y el análisis bioquímico utilizados en este estudio quedan reflejados en la tabla 4.

Parámetros hematológicos	
Hematocrito (%)	40,00-63,00
Hemoglobina (g/dl)	13,00-21,00
Glóbulos rojos x 10 ⁶ /μl	5,70-8,90
Leucocitos x 10 ³ /μl	4,60-17,40
Neutrófilos /μl (%)	3000-11500 (45,00-76,00)
Linfocitos /μl (%)	1000-4800 (16,00-45,00)
Monocitos /μl (%)	150-1350 (1,00-8,00)
Eosinófilos /μl (%)	100-1250 (1,00-10,00)
Basófilos /μl (%)	0-100 (0,00-2,00)
Parámetros bioquímicos	
Urea (mg/dl)	8,00-33,00
Creatinina (mg/dl)	0,70-1,60
ALT (GPT) (U/l)	28,00-78,00
Proteínas totales (g/dl)	5,00-7,00
Albúmina (g/dl)	2,3-3,4
Ratio Albúmina/Globulinas	0,7-1,5

Tabla 4. Valores hematológicos y bioquímicos de referencia para la especie canina.

4.2.5 ANÁLISIS COPROLÓGICO SERIADO PARA LA DETECCIÓN DE PARÁSITOS

Se solicitó a los dueños recoger heces de tres días consecutivos, conservando las de los dos primeros días en refrigeración, para realizar un análisis parasitológico. Las heces se remitieron al Laboratorio de Parasitología del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid, donde se analizaron mediante dos técnicas indirectas, los métodos Telemann y M.I.F. (solución Formol-Merthiolate-Yodo). El método Telemann combina técnicas de sedimentación y flotación, mientras que el método M.I.F. utiliza la tinción para preservar las heces y detectar protozoos de una forma más fácil.

También se realizó un método de observación directa de las heces al microscopio óptico. Para ello, tras la exploración física del animal, se tomó una muestra de heces vía rectal, sin lubricante, que se emulsionó con unas gotas de solución salina fisiológica en un portaobjetos. Se observaron las heces bajo el microscopio óptico (Olympus® Model CX31RBSF), a un aumento de 40x, en la propia consulta.

4.2.6 PRUEBAS DE MALDIGESTIÓN

Se realizó una determinación de quimotripsina, en una muestra de heces, con el fin de descartar la existencia de una insuficiencia pancreática exocrina.

La determinación de quimotripsina fecal se realizó en el Laboratorio de Biopatología del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense, mediante un método colorimétrico (Chymotrypsin, MPR 1, 718211, Roche®). Los valores normales de referencia para la especie canina son los de una quimotripsina fecal mayor de 7U/g de heces.

En los casos en los que este análisis mostró un resultado poco concluyente (3-7 U/g de heces), se solicitó una prueba de T.L.I. (*trypsin like immunoreactivity*). Esta determinación se realizó en suero, mediante técnicas de radioinmunoanálisis. Para ello se extrajeron 5 mililitros de sangre de la vena cefálica o yugular del paciente y se depositaron en un tubo estéril de 5 mililitros sin anticoagulante. Este tubo se centrifugó para la separación del suero, el cual se remitió a la Facultad de Veterinaria de Utrecht (Holanda), para la

determinación de T.L.I.. Para esta prueba se exigió un periodo de ayuno de sólidos y líquidos previo a la extracción de sangre de 8 horas. Valores de T.L.I. entre 5 y 40µg/l se han considerado normales para la especie canina.

4.2.7 ECOGRAFÍA ABDOMINAL

La ultrasonografía abdominal se llevó a cabo en el Servicio de Diagnóstico por Imagen del Hospital Clínico Veterinario, con un ecógrafo Philips HD11 o Philips SD800. Se valoró:

- La presencia de engrosamiento de algún segmento de la pared intestinal.
- La pérdida de la diferenciación de capas de la pared intestinal.
- La presencia de linfadenopatías mesentéricas.

Además, la ecografía permitió descartar la presencia de patologías u organomegalias en otros órganos de la cavidad abdominal.

4.2.8 EXPLORACIÓN ENDOSCÓPICA

4.2.8.1 PREPARACIÓN PREVIA DE LOS ANIMALES

Todos los animales fueron sometidos a una endoscopia digestiva superior con toma de biopsias. Para ello, recibieron una preparación previa, retirándoles la ingesta de alimentos 24 horas antes de la exploración, y el agua de bebida 12 horas antes de la exploración endoscópica del aparato digestivo superior.

4.2.8.2 PROTOCOLO ANESTÉSICO

La exploración endoscópica se realizó bajo anestesia general, con el consentimiento escrito de los propietarios, a cargo del Servicio de Anestesia del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense.

Se realizó un estudio previo a la anestesia, que incluyó una analítica sanguínea básica (hematología y bioquímica), y un estudio electrocardiográfico.

Se premedicó a los animales con acepromacina (0,05 mg/kg; Calmo Neosan ® inyectable, Pfizer, S.A.) y butorfanol (0,4 mg/kg; Torbugesic, Fort Dodge Veterinaria) por vía intramuscular, y se esperó aproximadamente media hora para obtener un grado de sedación adecuado. Se cateterizó una vena cefálica con un catéter intravenoso de 18 a 22G en función del tamaño del paciente y se preoxigenó con oxígeno al 100% administrado a través de una mascarilla facial. Se indujo la anestesia con propofol (Propofol-Lipuro® 1%, B. Braun Medical S.A.) a dosis efecto por vía intravenosa. El catéter intravenoso se conservó durante toda la anestesia para tener una vía de acceso rápida en caso de aparecer complicaciones anestésicas. Se procedió a la intubación endotraqueal, con tubos endotraqueales de diámetro adecuado en función del tamaño del paciente. El mantenimiento anestésico se llevó a cabo con isoflurano (Isoflurano Inibsa®, Roída Organique Fine Ltd.) a una concentración espirada de 1,3 - 1,5% administrado en una mezcla de oxígeno al 40% y aire, que se mantuvo hasta el final de la exploración. Se utilizó una máquina para el mantenimiento anestésico (SA2, Dräger), con ventilador mecánico, en todos los animales. La monitorización del paciente incluyó: electrocardiograma, pulsioximetría, presión arterial no invasiva (mediante sistema oscilométrico), espirometría y capnografía.

4.2.8.3 EXPLORACIÓN ENDOSCÓPICA

Para la realización de las endoscopias digestivas superiores se utilizaron tres videoendoscopios, en función del tamaño del animal:

- Modelo Fujinon EG-200FP, de 110 centímetros de longitud y 9,8 milímetros de diámetro.
- Modelo Fujinon EC-200LR, de 180 centímetros de longitud y 14 milímetros de diámetro.
- Modelo Fuginon EG-270-N5, de 110 centímetros de longitud y 6 milímetros de diámetro.

Se tomaron fotografías durante las exploraciones, con un video Printer Sony UP-2300P, incluido en la columna de videoendoscopia.

Las endoscopias se realizaron con el animal colocado en decúbito lateral izquierdo, de modo que el posible contenido gástrico se situase en la zona del fundus gástrico, para facilitar la exploración de cuerpo gástrico y antro pilórico, y el paso al duodeno. En todos los casos se exploró esófago, estómago y primera porción de duodeno, aunque esta última porción es la que será objeto del presente estudio.

Sobre la base de los parámetros endoscópicos establecidos por el Grupo de Estandarización Gastrointestinal de la WSAVA (World Small Animal Veterinary Association; Washabau y col., 2010) para la evaluación de inflamación gastrointestinal en animales de compañía, y para poder evaluar los casos de nuestros tres grupos de estudio, que corresponden tanto a procesos inflamatorios como desórdenes linfoproliferativos, hemos utilizado los siguientes parámetros endoscópicos referentes a intestino delgado:

- Mucosa engrosada
- Mucosa irregular
- Mucosa congestiva
- Soluciones de continuidad
- Puntos blancos
- Mucosa de consistencia friable a la toma de biopsias
- Mucosa de consistencia aumentada (dura) a la toma de biopsias

Cada uno de estos parámetros fue valorado de 0 a 2, siendo:

0 = normal

1 = alteración de grado leve-moderado

2 = alteración de grado intenso

Excepto los parámetros de mucosa de consistencia friable o de consistencia aumentada a la toma de biopsias, que se valoraron:

0 = ausencia

1 = presencia

Con el fin de facilitar el estudio estadístico y establecer una valoración del grado de alteración general a nivel endoscópico, hemos calculado un **índice de alteración endoscópica**. En este índice, teniendo en cuenta que contamos con un conjunto de pacientes heterogéneo, se han incluido los siguientes parámetros:

- Mucosa engrosada
- Mucosa irregular
- Mucosa congestiva
- Soluciones de continuidad

4.2.9 OBTENCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS

4.2.9.1 TOMA DE BIOPSIAS

Todas las muestras de este estudio se obtuvieron mediante endoscopia digestiva superior. Para ello se utilizó una pinza de biopsia tipo cazoleta sin aguja central, de diferente diámetro en función del endoscopio utilizado.

Se tomaron aproximadamente 6-8 biopsias de diferentes zonas de duodeno de cada animal, aumentando las posibilidades de detección de lesiones de tipo “parcheado” (Willard y col., 2001; Willard y col., 2008); e incluso varias biopsias del mismo punto, tratando de profundizar en la pared duodenal para detectar lesiones más profundas (Willard y col., 2008). Las biopsias, inmediatamente después de su obtención, se introdujeron en tubos con formol tamponado al 10% (Panreac© ref. 253572 estabilizado con metanol a pH = 7).

4.2.9.2 PROCESADO DE LAS BIOPSIAS

Las biopsias endoscópicas de nuestros animales siguieron el procesado rutinario del Laboratorio de Histología del Hospital Clínico Veterinario.

Las muestras se fijaron en formol tamponado comercial al 10 % (Panreac© ref. 253572 estabilizado con metanol a pH = 7) durante 24 horas a temperatura ambiente. Después fueron incluidas en parafina sintética (Casa Álvarez Histo-comp, ref. CA-09-5658), con un punto de fusión de 56°C, utilizándose un procesador automático de tejidos (Leica© ASP 300), con un programa de cambios automáticos de alcoholes de creciente graduación e histo-clear. Los bloques fueron realizados en una unidad formadora de bloques, consola Leica© EG1140H y placa de frío Leica© EG1130. En todos los casos se orientaron las biopsias para facilitar su diagnóstico, como se recomienda en trabajos recientes (Willard y col., 2010).

Los cortes histológicos se obtuvieron con un microtomo de rotación marca Leica© (modelo LEICA RM 2155®) a 3-4 µm de grosor, y posteriormente se llevaron a un baño de flotación (Leica© HL1210).

Las secciones se desparafinaron en xilol (Panreac© ref.211769), se hidrataron en una serie decreciente de alcoholes y agua, empleándose a continuación el método de tinción de hematoxilina-eosina convencional, en el teñidor automático Leica© SP4040. A continuación, se deshidrataron primero en una serie creciente de alcoholes, después se bañaron en xilol y finalmente se montaron con DPX® (Nustain©).

También se han realizado las tinciones de ácido periódico de Schiff (PAS), y el tricrómico de Masson. La técnica histoquímica de PAS no ha permitido el estudio de la integridad del epitelio superficial, así como la detección de hiperplasia de las células caliciformes. La técnica de Masson nos ha permitido determinar el grado de fibrosis de las muestras en las lesiones intestinales.

4.3 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

El estudio histopatológico de las muestras de duodeno, obtenidas mediante endoscopia, se basó en la observación y valoración de una serie de parámetros bajo el microscopio óptico.

En primer lugar, se evaluaron los parámetros publicados por el grupo de estandarización gastrointestinal de la WSAVA (World Small Animal Veterinary Association; Day y col., 2008) para el diagnóstico de la inflamación gastrointestinal en biopsias endoscópicas en el perro y el gato. Estos parámetros, para nuestra zona de estudio, el duodeno, son los siguientes:

- Relacionados con rasgos morfológicos:
 - Acortamiento-ensanchamiento de vellosidades
 - Lesión epitelial
 - Dilatación de las criptas
 - Dilataciones linfáticas
 - Fibrosis

- Relacionados con inflamación:
 - Linfocitos intraepiteliales
 - Infiltrado de linfocitos y células plasmáticas en lámina propia
 - Infiltrado de eosinófilos en lámina propia
 - Infiltrado de neutrófilos en lámina propia

Para cada uno de los parámetros se establecen cuatro categorías, que hemos denominado:

- 0 = mucosa normal
- 1 = lesión leve
- 2 = lesión moderada
- 3 = lesión intensa

Utilizando los parámetros de la WSAVA hemos establecido el **índice de gravedad de la lesión inflamatoria duodenal a nivel histopatológico**, como la suma de las puntuaciones alcanzadas en los nueve parámetros, que va de 0 a 27.

Además de éstos, hemos considerado otros parámetros que pueden resultar de interés, aplicables a un proceso inflamatorio intestinal. Sin embargo, debemos ser conscientes de que entre nuestros casos nos encontramos con algunos que tendrán una enfermedad inflamatoria crónica intestinal, pero en otros apreciamos, además, cambios neoplásicos, aunque exista un infiltrado inflamatorio concomitante. Por ello, además de evaluar los parámetros establecidos para inflamación, hemos incluido una serie de parámetros más relacionados con el linfoma intestinal canino y felino (Kiupel y col., 2011; Briscoe y col., 2011; Gieger y col., 2011; Moore y col., 2012):

- Patrón del infiltrado en lámina propia
 - Focal o multifocal
 - Difuso
 - Densidad baja (<2 células en ancho de vellosidad)
 - Densidad media (3-6 células)
 - Densidad alta (>6 células)
 - A partir de folículos linfoides
- Localización del infiltrado en las vellosidades
 - En forma de parches en lámina propia
 - En forma de banda en lámina propia
 - Obliteración de la lámina propia de las vellosidades
 - Obliteración de la lámina propia
- Linfocitos intraepiteliales:
 - Localización:
 - En epitelio superficial
 - En epitelio de las criptas
 - Afectación:
 - Afectación difusa
 - Afectación de una sola vellosidad
 - Organización:
 - Células aisladas
 - Formando nidos mayores de cinco linfocitos
 - Formando placas que llegan a barrer cinco células epiteliales
- Estructura de la pared intestinal
 - Conservación
 - Pérdida

- Patrón morfológico de los linfocitos
 - Monomórfico
 - Polimórfico
- Y algunos parámetros que sólo es posible estudiar en los casos del grupo Linfoma:
- Tamaño celular según la OMS (Valli y col., 2002)
 - Células pequeñas (<2 eritrocitos)
 - Células grandes (>2 eritrocitos)
 - Pleomorfismo celular
 - Presencia
 - Ausencia
 - Número de figuras mitóticas: se ha valorado el número de mitosis en un total de 10 campos a 40x (Ozaki y col., 2006; Kamstock y col., 2011).
 - Morfología celular: se ha analizado la forma de las células, la presencia de nucleolos evidentes o múltiples, la apariencia de la cromatina, y el citoplasma. La morfología celular se tratará de forma descriptiva.
 - Se van a clasificar los linfomas utilizando la clasificación de la OMS para Veterinaria (Valli y col., 2002; Head y col., 2003), y las nuevas clasificaciones para medicina humana (Swerdlow y col., 2008; Campo y col., 2011)

4.4 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten detectar una gran variedad de antígenos presentes en las células o tejidos, utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a sus antígenos correspondientes. En el caso de este estudio se ha utilizado la técnica del complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa, de modo que utilizamos la enzima peroxidasa, que se unirá a un anticuerpo secundario a través de biotina, y posteriormente hará cambiar de color a la diaminobenzidina que utiliza como sustrato, a través de una reacción de oxidación-reducción. De esta forma, la aparición de un color pardo evidenciará la presencia del antígeno que buscamos.

Se ha realizado un estudio inmunohistoquímico para detectar la proteína nuclear Ki-67, determinante del índice de proliferación celular; así como los marcadores de linfocitos CD3 (para linfocitos T) y CD 20 (para linfocitos B). Como marcadores de linfocitos B se probaron los marcadores CD20 (polyclonal rabbit anti-CD20 de LabVision Corporation), CD79 (monoclonal mouse anti-human CD79 clon HM57, de DakoCytomation), y Pax-5 (monoclonal anti-Pax5, clon 24, de Ventana Medical Systems), considerándose CD20 el más adecuado, y en el que centraremos el estudio a partir de este punto.

El estudio inmunohistoquímico se llevó a cabo en cortes de biopsias endoscópicas de duodeno fijadas en formol e incluidas en parafina sintética, montados en portaobjetos ionizados (Superfrost Plus, Menzel-Glaser), con el fin de potenciar la adherencia de las muestras.

4.4.1 CONTROLES PARA EL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

En todas las series de preparaciones se incluyeron controles positivos y negativos para poder confirmar la eficacia de las técnicas. Los controles negativos se consiguieron incubando las secciones con TBS en lugar de con el anticuerpo primario. Los controles positivos variaron según el anticuerpo primario empleado:

- Ki-67: se utilizó un positivo endógeno, en las propias muestras de duodeno, la zona profunda de las criptas de Lieberkühn, que se corresponde con la zona proliferativa del epitelio.
- CD3 y CD20: se utilizaron cortes de ganglio linfático sano, de la especie canina, obtenidos de perros de la sala de necropsias. Se observó tinción positiva frente a CD3 fundamentalmente en la cortical, en la zona parafolicular, lugar preferente de localización de linfocitos T; y tinción positiva frente a CD20 también en la cortical, fundamentalmente en los folículos linfoides, localización principal de los linfocitos B.

4.4.2 TÉCNICA EMPLEADA PARA KI-67 Y CD3

Para la detección inmunohistoquímica de Ki-67 y CD3 se empleó la técnica del complejo estreptavidina biotina peroxidasa, siguiendo un protocolo manual. La técnica básica de trabajo utilizada para Ki-67 y CD3, con pequeñas diferencias en el procedimiento según las recomendaciones técnicas específicas para cada proteína o las diferencias encontradas en la puesta a punto de las técnicas, consta de los siguientes pasos básicos:

1) Desparafinado y rehidratado de las muestras

Desparafinado en xilol (Panreac© ref.211769) e hidratación en alcoholes de serie decreciente y paso a agua destilada. Cada etapa tiene un tiempo estándar de 5 minutos, realizándose todo el proceso en la estación lineal de tinción (Leica© SP4040),

2) Desenmascaramiento antigénico

Se realizó por presión y temperatura mediante una olla a presión, con 1,5 litros de buffer citrato (10mM; pH 6). Una vez alcanzada la máxima presión y temperatura las preparaciones se dejaron en esas condiciones durante tres minutos, para posteriormente parar la presión y sacar las preparaciones, que se dejaron enfriar 20 minutos a temperatura ambiente antes de proceder al lavado.

3) Lavado

Un lavado en agua destilada seguido de un lavado en buffer TBS (0,1 M Tris base, 0.9% NaCl, pH 7,4), cada uno de 5 minutos.

4) Inhibición de la peroxidasa endógena

Se sumergieron las preparaciones en una solución de 100 mililitros de metanol (Panreac© ref. 141091.1214) y 1,5 mililitros de peróxido de hidrógeno (Panreac© ref. 141077), durante 15 minutos.

5) Lavado II

Dos lavados en agua destilada, de 5 minutos cada uno, seguidos de otros dos lavados en TBS a pH 7,4, también de 5 minutos cada uno.

6) Incubación con suero normal

Este paso se utilizó para el anticuerpo primario policlonal, es decir, el marcador linfocitario CD3, para evitar uniones inespecíficas. Se incubaron las preparaciones con suero normal de cabra a concentración 1:30 durante 30 minutos. Este paso no se realizó en el caso del anticuerpo monoclonal Ki-67.

7) Anticuerpo primario

Se incubaron las preparaciones con el anticuerpo monoclonal/policlonal frente a la proteína elegida a una determinada concentración (tabla 5) durante toda la noche, en cámara húmeda y en refrigeración a 4°C.

	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Ki-67	Anticuerpo monoclonal anti-Ki-67 humano (clon SP6), obtenido en conejo, de Master Diagnóstica – LabVision Corporation, prediluido, listo para su uso.	Suero secundario biotinilado anti-IgG de conejo, obtenido en cabra, de Vector Laboratories, a una dilución de 1:400.
CD3	Anticuerpo policlonal anti-CD3 humano, obtenido en conejo, de DakoCytomation, a una dilución de 1:100.	Suero secundario biotinilado anti-IgG de conejo, obtenido en cabra, de Vector Laboratories, a una dilución de 1:400.

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para las técnicas inmunohistoquímicas de Ki-67 y CD3α

8) Lavado III

Se lavaron las preparaciones dos veces en TBS a pH 7,4, cada una de cinco minutos.

9) Anticuerpo secundario

En el caso de Ki-67, obtenida en conejo, y de CD3, anticuerpo policlonal, se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de conejo obtenido en cabra, de DakoCytomation (Glostrup, Denmark), dilución 1:400 (tabla 5).

10) Lavado IV

Se lavaron las preparaciones dos veces en TBS a pH 7,4, cada una de cinco minutos, como se había hecho en el lavado III.

11) Estreptavidina-peroxidasa

Se incubaron las preparaciones con estreptavidina conjugada con peroxidasa (HRP-Streptavidin conjugate, code No. 43-4323, Zymed Lab. INC) a una dilución 1:400 durante 30 minutos, en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

12) Lavado V

Se lavaron las preparaciones dos veces en TBS a pH = 7,4, cada una de cinco minutos, como se había hecho en los lavados III y IV.

13) Revelado con DAB (diaminobencidina)

Revelado con diaminobencidina (DAB substrate kit SK-4100), de Vector Laboratorios (Burligame, CA, USA). Se utilizó un kit comercial, añadiendo, para 1 mililitro de agua destilada, los reactivos por este orden: 20µl de buffer, 40µl de DAB y 20µl de peróxido de hidrógeno. Las preparaciones se revelaron en esta solución un máximo de 10 minutos. El tiempo depende de lo que tardan las preparaciones en adquirir un color marrón tabaco, y se utiliza un tiempo estándar para una misma proteína en todas las preparaciones.

14) Lavado VI

Lavado en agua corriente durante varios minutos.

15) Contraste con hematoxilina

Se contrastaron las preparaciones con hematoxilina de Carrazzi durante 3-4 minutos.

16) Deshidratación y montaje

Se lavaron y se deshidrataron las preparaciones en una serie creciente de alcoholes y xilol y se montaron en DPX® (Nustain).

4.4.3 TÉCNICA EMPLEADA PARA CD20

Esta técnica se realizó en el Diagnostic Center for Population and Animal Health (DCPAH), Michigan State University (Lansing, MI, USA), utilizando la máquina automática para inmunohistoquímica Bond-Max™ (Leica Microsystems).

Se utilizaron cortes incluidos en parafina, montados sobre portaobjetos ionizados, que en primer lugar se incubaron en una estufa a 70°C durante 20 minutos, para favorecer la adherencia del tejido.

El anticuerpo primario utilizado fue el anticuerpo policlonal anti-CD20 (Thermo Scientific – LabVision Corporation, Fremont, CA, USA), testado en el perro para plasmocitomas y linfomas multicéntricos con buenos resultados (Jubala y col., 2005; Ramos-Vara y col., 2007), a una dilución de 1:500.

A continuación se realizó la técnica inmunohistoquímica de forma automática en la máquina Bond-Max™ (figura 2), que constó de los pasos que se especifican a continuación.



Figura 2. Automatizador de inmunohistoquímica Bond-Max™ (Leica Microsystems).

1. Desparafinado y rehidratado de las muestras

Se realizaron tres lavados con “Bond™ Dewax Solution”, a 72°C, para después realizar tres lavados con Alcohol 100% a temperatura ambiente, y otros tres con “Bond™ Wash Solution”, el último de cinco minutos, a temperatura ambiente también.

Con este anticuerpo no fue necesario realizar ningún tipo de desenmascaramiento antigénico, dada la buena reactividad de las muestras.

2. Bloqueo de la peroxidasa endógena

Se utilizó el reactivo incluido en el kit Bond™ Polymer Refine Detection, con peróxido de hidrógeno al 3-4%, a temperatura ambiente, durante cinco minutos.

3. Lavado I

Tres veces con Bond Wash Solution.

4. Anticuerpo primario

Incubación con 150µl del anticuerpo policlonal anti-CD20 (LavVision, Fremont, CA), a una dilución de 1:500 durante 15 minutos, a temperatura ambiente.

5. Lavado II

Se realizaron tres lavados consecutivos con “Bond Wash Solution” a temperatura ambiente.

6. Anticuerpo secundario

Incubación con el anticuerpo secundario incluido en el kit Bond™ Polymer Refine Detection: anti-rabbit Poly-HRP-IgG con un 10% de suero animal en buffer TRIS. Durante 25 minutos, a temperatura ambiente.

7. Lavado III

Lavado con Bond Wash Solution durante cinco minutos a temperatura ambiente, seguido por otros tres lavados con Bond Wash Solution y un último lavado con agua destilada.

8. Revelado con DAB

Revelado con Diaminobecidina, incluida en el kit Bond™ Polimer Refine Detection, durante 10 minutos, a temperatura ambiente.

9. Lavado IV

Tres lavados con agua destilada a temperatura ambiente.

10. Contraste con hematoxilina

Se contrastaron las preparaciones con la Hematoxilina (<0,1%) incluida en el kit Bond™ Polymer Refine Detection, durante 5 minutos, a temperatura ambiente.

11. Lavado V

Tres lavados con agua destilada, a temperatura ambiente.

12. Deshidratación y montaje automático

Con el último lavado terminó el procesado realizado con la máquina Bond-Max™. Se recogieron las preparaciones y se trasladaron al procesador de preparaciones Symphony (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Arizona, Estados Unidos) (figura 3), donde se realizó la deshidratación en una serie creciente de alcoholes y xilol, y el montaje de las preparaciones con un cubreobjetos.



Figura 3. Procesador de preparaciones Symphony (Ventana Medical Systems)

4.4.4 VALORACIÓN DE LA INMUNOTINCIÓN

4.4.4.1 VALORACIÓN DE KI-67

La inmunotinción positiva para Ki-67 se observó como una tinción nuclear de color marrón. Para establecer un índice de expresión, se contó el número total de células linfoides en cinco campos representativos de cada preparación, con el objetivo de 40X, en un microscopio óptico Olympus BX50, diferenciando las células positivas y negativas. Para esto se tomaron imágenes fotográficas de las muestras de inmunohistoquímica, con el programa Viewfinder Lite versión 1.0 , que posteriormente se sometieron a un análisis informático para establecer

un índice de expresión. Este análisis se realizó en un ordenador preparado con el software de análisis de imagen Micro Image versión 4.0 para Windows. Así, se obtuvo el porcentaje de células positivas por campo a 40X. A continuación, se calculó el porcentaje de positividad de cada muestra, como media de los porcentajes de positividad de los cinco campos analizados.

Según el porcentaje obtenido se estableció el **índice de proliferación celular (IP)** para cada muestra, que se define como el porcentaje de células en proliferación; en este caso determinado por el número de células positivas frente al antígeno Ki-67. Éste incluye células en las fases G₁, S, G₂ o M del ciclo celular.

4.4.4.2 VALORACIÓN DE CD3 Y CD20

La inmunotinción positiva, tanto para CD3 como para CD20 se observó como una tinción marrón en la membrana plasmática y/o en el citoplasma de los linfocitos. Ambas proteínas tiñen linfocitos tanto normales como neoplásicos de tipo T (en el caso de CD3) o de tipo B (en el caso de CD20).

Estas dos proteínas se valoraron de forma conjunta para cada una de las muestras, estableciéndose el inmunofenotipo de cada una de las lesiones como: inmunofenotipo T, inmunofenotipo B, inmunofenotipo mixto, o inmunofenotipo no-T no-B, según la expresión predominante.

4.5 ESTUDIO DE LA CLONALIDAD DE LINFOCITOS T: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de PCR tiene como objetivo la amplificación selectiva de un fragmento de ADN, a partir de oligonucleótidos sintéticos, llamados primers o cebadores, de unas 18-25 pb, complementarios a los extremos de la región que se quiere amplificar.

Como se ha comentado previamente, el linfoma T intestinal se caracteriza por un infiltrado monoclonal de linfocitos neoplásicos, acompañados de un intenso infiltrado inflamatorio que, en ocasiones, puede ser difícil de diferenciar del infiltrado presente en la mucosa intestinal de un IBD grave mediante técnicas histológicas.

En este caso, estamos interesados en detectar poblaciones monoclonales de linfocitos T, ya que la clonalidad es un rasgo característico de malignidad tumoral. De este modo podremos potencialmente distinguir una población reactiva de una población neoplásica de linfocitos. Para ello, vamos a amplificar secuencias únicas de ADN, las regiones CDR3 del receptor gamma de células T (TCR γ) canino. La región CDR3 del gen del receptor de células T (TCR γ) codifica la región de unión del antígeno de dicho receptor, y contiene la mayoría de esta secuencia única. En las células T la región CDR3 del gen TCR γ se produce a través de la recombinación de los genes V (variable) y J (joining-unión). Durante el proceso de recombinación, entre 5 y 20 nucleótidos aleatorios se añaden entre cada segmento génico, creándose genes con una amplia diversidad en secuencia y longitud. Se van a utilizar cebadores para las regiones conservadas de los genes V y J para amplificar CDR3, seguidos de la separación por tamaño de los productos de la PCR (Burnett y col., 2003).

El proceso de amplificación de ADN comprende tres fases: desnaturalización de las hebras de ADN, hibridación de los cebadores, y extensión.

La desnaturalización supone la separación de la doble cadena de ADN en dos hebras simples debido a la ruptura de los puentes de hidrógeno. Se realiza mediante calor, a temperaturas de 94-98°C, dependiendo de la longitud del

fragmento que queremos amplificar, el contenido en guanina y citosina, y la fuerza iónica.

La hibridación de los cebadores se produce en las secuencias complementarias de ADN, que sirven como punto de partida para que la enzima ADN-polimerasa empiece a incorporar desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) para la síntesis de nuevas hebras de ADN. Para que un cebador sea efectivo debe tener una longitud adecuada, de 18-24 nucleótidos (en cualquier caso menor de 30 nucleótidos), y no tener muchas repeticiones de nucleótidos, para evitar el riesgo de que se formen bucles. La hibridación de los cebadores se produce a temperaturas de 40-68°C.

En el proceso de extensión, la ADN-polimerasa sintetiza una nueva cadena de ADN, complementaria a la cadena de ADN molde, mediante la adición de dNTPs, en dirección 5' a 3'. La temperatura de extensión depende de la ADN-polimerasa empleada. Esto se repite durante una serie de ciclos, de forma que se obtiene un número elevado de copias de ADN, que se pueden visualizar posteriormente empleando geles de electroforesis.

Las técnicas de PCR utilizadas en este trabajo se realizaron en el laboratorio de Virología del Diagnostic Center for Population and Animal Health, Michigan State University, MI, Estados Unidos.

4.5.1 DESPARAFINADO DE LAS MUESTRAS

Se utilizaron muestras de biopsias endoscópicas incluidas en parafina, de modo que fue necesario el desparafinado de los tejidos previo a la extracción del ADN. Se partió de 5 cortes de 6µm de grosor de cada una de las muestras, que se colocaron en un tubo tipo eppendorf para proceder al desparafinado.

Para el desparafinado se utilizó el kit: QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo del fabricante, en tres pasos básicos:

1. Eliminación de la parafina: se disuelve en xilol y es retirada. Para ello añadimos soluciones de xilol y etanol alternativamente (900µl en cada muestra) y centrifugamos, retirando el sobrenadante, para después dejar secar el precipitado a temperatura ambiente durante 30 minutos.

2. Lisis: la lisis se llevó a cabo con proteinasa K. Se añadieron 180µl de buffer ATL y 20µl de proteinasa K en cada eppendorf, para después mezclar y machacar el tejido con un bastoncillo proporcionado en el kit.
3. Tratamiento con calor: se incubaron las muestras en un baño a 56°C durante una hora, para después pasar a otro baño a 90°C durante otra hora. Así, se revirtieron las reacciones cruzadas de la formalina.

4.5.2 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN, a partir de los tejidos desparafinados, se realizó de forma automática con QIAcube (QIAGEN, figura 4), utilizando columnas QIAampMinElute Column (QIAGEN), siguiendo el protocolo del fabricante.

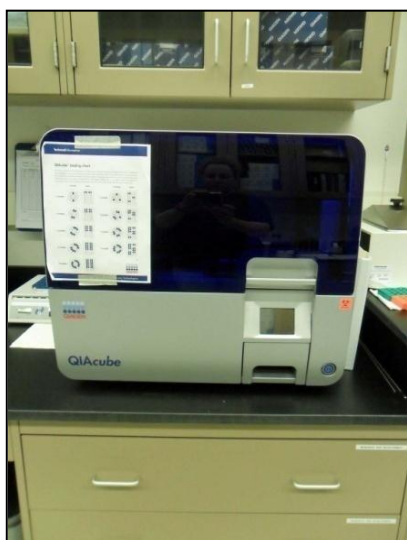


Figura 4. Máquina QIAcube para la extracción automática de ADN .

El proceso consta de los siguientes pasos:

- Resuspensión, lisis y neutralización.
- Transferencia del lisado.
- Limpieza por centrifugación y transferencia del lisado limpio.
- Unión.
- Lavado.
- Transferencia a la columna.
- Elusión.
- Obtención de ADN puro.

Se utilizó un control de extracción en cada tanda de muestras, para comprobar que no existía contaminación cruzada. Este control se hizo añadiendo 180µl de buffer ATL y 20µl de proteinasa K a un eppendorf vacío.

4.5.3 PREPARACIÓN DE MASTERMIX (PREMEZCLA DE REACTIVOS)

Para preparar MasterMix se utilizó el kit Type-it mutation detect PCR kit (QIAGEN), que incluye la polimerasa termorresistente HotStarTaq Plus ADN-polimerasa, desoxirribonucleótidos (dNTPs) y Type-it mutation detect PCR buffer.

La preparación de MasterMix se realizó siempre en una sala limpia, en la que no se llevó a cabo ningún proceso que implicase manipulación de ADN. Para evitar contaminación, ninguna persona podía entrar a esta sala con la bata utilizada en otro laboratorio, y se debían utilizar guantes limpios.

Los cebadores o primers utilizados fueron los siguientes (Burnett y col., 2003):

- TCRγ1: ACC CTG AGA ATT GTG CCA GG (región J)
- TCRγ2: GTT ACT ATA AAC CTG GTA AC (región J)
- TCRγ3: TCT GGG A/GTG TAC/T TAC TGT GCT GTC TGG (región V)

Para preparar MasterMix para 20 pocillos, las cantidades utilizadas fueron las siguientes:

- 382µl de agua limpia de DNAsa
- 500µl de HotStarTaq ADN-polimerasa (del kit, con buffer y dNTPs incluidos)
- 6µl de cada uno de los cebadores

4.5.4 PROCESADO DE LAS MUESTRAS MEDIANTE PCR

Se realizó PCR de todas las muestras por duplicado (45µl de MasterMix y 5µl del extracto de ADN correspondiente). En cada tanda de muestras se incluyó, además:

- El control de extracción correspondiente.
- Control negativo sin ADN: MasterMix (45µl) y agua limpia de DNAsa (5µl).
- Control positivo: una muestra de monoclonalidad conocida.

- Control negativo policlonal: una muestra de policlonalidad conocida.

Se utilizó un termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, figura 5). El ciclo empleado fue el que se indica en la tabla 6.



Figura 5. Termociclador Thermal Cycler 2720.

Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo
1x	94°C	5 min
45x	94°C	30 seg
	60°C	90 seg
	72°C	30 seg
1x	72°C	7 min
1x	4°C	∞

Tabla 6. Ciclos empleados para la PCR convencional.

Una vez amplificado el ADN, se realizó un análisis Heteroduplex, es decir, se traspasaron 23 µl de las muestras originales amplificadas a nuevos tubos y se procedió a desnaturalizar el ADN de nuevo para volver a unir las dos hebras de ADN, antes de proceder a su lectura en el gel de electroforesis. La desnaturalización siguió el ciclo que se indica en la tabla 7.

Ciclos	Temp (°C)	Tiempo
1x	94	10 min
1x	4°C	1 hora

Tabla 7. Ciclos empleados para la PCR heteroduplex.

4.5.5 LECTURA DE LA PCR

4.5.5.1 LECTURA AUTOMÁTICA EN QIAXCEL ADVANCED

El sistema QIAxcel Advanced (QIAGEN Inc., Valencia, California, Estados Unidos) es un sistema automático de electroforesis capilar de alta resolución (figura 6).



Figura 6. Sistema QIAxcel Advanced, sistema capilar de electroforesis de alta resolución.

El sistema QIAxcel Advanced utiliza electroforesis capilar en gel, permitiendo una rápida separación de los ácidos nucleicos según su tamaño. En lugar del gel de agarosa tradicional, utiliza un cartucho con un gel preformado. De esta manera, cada muestra es cargada en un capilar individual, migrando los ácidos nucleicos cargados negativamente hacia el polo positivo del capilar, al igual que ocurre en los geles de agarosa tradicionales.

Según las moléculas de ADN migran a través del capilar, pasan a través de un detector que mide la señal fluorescente. Un detector fotomultiplicador convierte esa señal en datos electrónicos, que se transfieren al ordenador para su posterior análisis con el software QIAxcel ScreenGel Software. Este programa calcula el tamaño de los fragmentos de ADN, en pares de bases, comparándolos con el marcador de referencia de longitud. Estos datos, una vez procesados, pueden visualizarse, en forma de electroferograma, o en forma de imagen de gel en el monitor del ordenador.

En este estudio se ha utilizado el kit QIAxcel DNA High Resolution, con un marcador de alineación de 15-500 pares de bases, y un marcador de referencia de longitud de 25-500 pares de bases.

4.5.5.2 LECTURA EN EL GEL DE ELECTROFORESIS

Para la lectura en el gel de electroforesis, el producto amplificado se mezcló con un tampón de carga antes de cargarlo en el gel. El tampón de carga utilizado fue el “Gel Loading Dye Blue” (Biolabs, Inc., New England, Estados Unidos), 5µl por muestra, compuesto (1x) por azul de bromofenol al 0,015%, SDS al 0,017% y Ficoll 400 al 2,5%, 11mM EDTA, en 3,3mM Tris-HCl. La función de este tampón es la de dar coloración a la mezcla para posibilitar su visualización en el gel, así como aportar solidez para que, al cargar la mezcla en el gel, quede al fondo del pocillo.

Se ha utilizado un gel de electroforesis de agarosa al 4%. La agarosa es un polisacárido natural que se disuelve con calentamiento y le confiere rigidez al gel. A mayor concentración de agarosa, mayor resistencia al avance de la muestra por el gel. En concreto, en nuestro estudio, se ha utilizado una cantidad de 1g de UltraPure Agarose (InvitrogenTM), y 3g de NuSieveGTC Agarose (Lonza BioResearch, San Diego, Estados Unidos), en solución con 100ml de Sodium Borate Buffer a pH = 8. A la mezcla del buffer con agarosa se añadieron 5µl de Bromuro de Etidio (Fisher Biotech, Wembley, Australia). Este compuesto se utiliza con la función de unirse al ADN, de modo que le confiere fluorescencia al exponerlo a luz ultravioleta, lo que nos permitirá visualizar los fragmentos de ADN amplificados.

Para cargar el gel se cargaron primero 14µl de marcador o ladder (Biolabs, Inc., New England, Estados Unidos) de 100 pares de bases, que nos permitiría después visualizar el tamaño de banda de nuestras muestras en el gel. Se cargaron, para cada muestra, 20µl de la mezcla compuesta por el ADN amplificado y el tampón de carga, en cada pocillo del gel.

Se utilizó una caja de electroforesis PowerPac BasicTM (Bio-Rad Laboratorios, Inc., Hercules, California, Estados Unidos), con una corriente de 150V y 400mA, durante 25 minutos (figura 7). Al ser un gel de agarosa al 4%, el tiempo de migración debía ser más largo de lo habitual.

La lectura del gel se realizó mediante su visualización con un transiluminador de luz ultravioleta (UVP Model M-15, Upland, California, Estados Unidos), conectado a una cámara fotográfica Canon PC1251 Powershot A720 IS (Canon, Inc. Estados Unidos), figura 7.

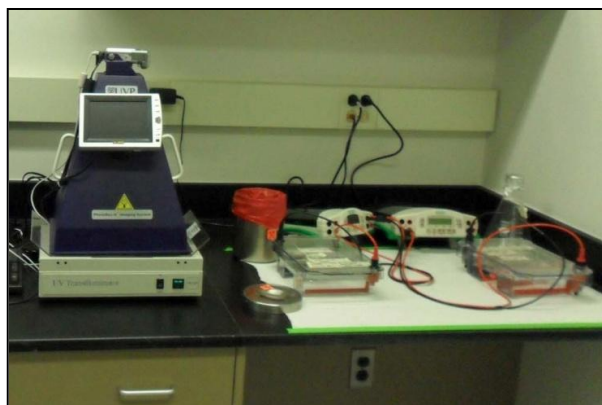


Figura 7. Caja de electroforesis y transiluminador ultravioleta conectado a una cámara fotográfica.

4.5.5.3. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La clonalidad de las poblaciones linfocitarias se va a determinar por el número y el tamaño de las bandas que aparecen en el gel de electroforesis, y en el electroferograma.

El producto amplificado es de aproximadamente 90 pares de bases (Burnett y col., 2003), por lo tanto, se considerará como resultado positivo la presencia de una o dos bandas dominantes en torno a esa longitud (80-100 bp), presentes en las muestras repetidas de cada caso, que indicará la presencia de una población clonal de linfocitos, consistente con un proceso neoplásico. La amplificación policlonal, correspondiente a un proceso no neoplásico, como la inflamación, se visualizará como varias bandas separadas por su tamaño que incluso pueden llegar a juntarse en la imagen del gel en una banda más ancha.

4.6 ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente en el Departamento de Apoyo a la Investigación del Área de Informática y Comunicaciones de la Universidad Complutense de Madrid.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS 19.0 para Windows.

Se realizó una estadística descriptiva de nuestra población de estudio, en cuanto a parámetros epidemiológicos, clínicos, endoscópicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos, utilizando porcentajes y valores absolutos. Se han utilizado, fundamentalmente, medias, desviaciones típicas, máximos, mínimos, medianas y desviaciones típicas de la media para variables cuantitativas; y frecuencias y porcentajes de las categorías para las variables cualitativas. Después, se realizó una estadística analítica, en busca de relaciones o diferencias significativas entre grupos, en las diferentes variables.

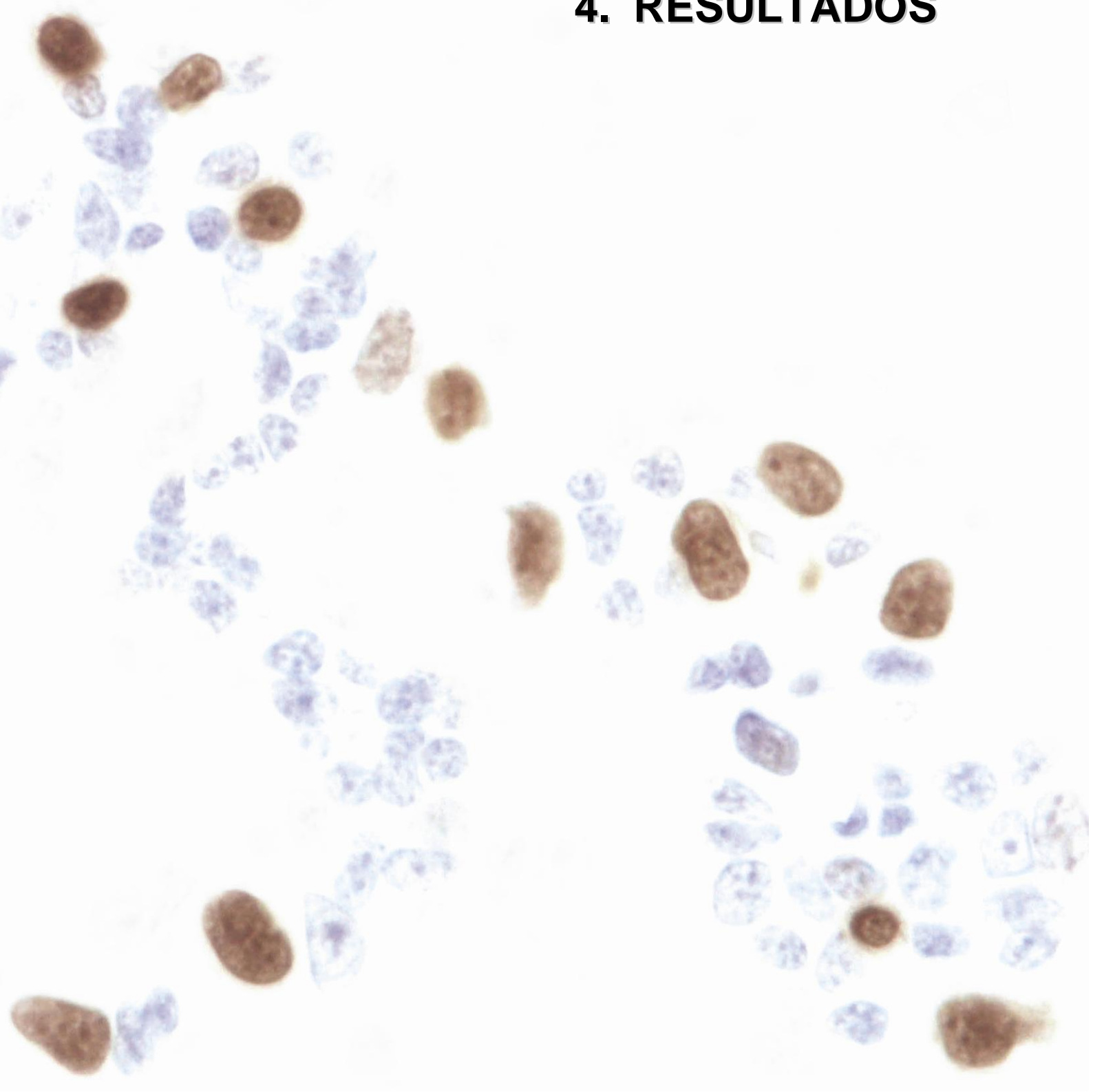
Los métodos estadísticos utilizados fueron los siguientes (SPSS, 2010):

- Estadística descriptiva de las variables cuantitativas (procedimiento DESCRIPTIVE) para la descripción de las muestras: media, desviación estándar, máximo, mínimo, mediana, desviación estándar de la media, etc. (Ferrán, 1996).
- Estadística descriptiva de las variables cualitativas (procedimiento FREQUENCIES), con la obtención de frecuencias y porcentajes de las categorías (Ferrán, 1996).
- Tablas de contingencia para la relación entre variables cualitativas (procedimiento CROSSTABS). Test de la chi-cuadrado (χ^2) para contrastar la independencia o influencia entre dos variables cualitativas, donde se emplea el test de la chi-cuadrado de Pearson con información en cada casilla de la tabla de contingencia del porcentaje en fila y los residuos corregidos no tipificados para ayudar

a descubrir las tramas en los datos que contribuyen a una prueba de chi-cuadrado significativa (Everitt, 1992 y Ferrán, 1996).

- Análisis de la varianza, ANOVA de 1 factor (procedimiento ONEWAY), para la comparación de múltiples medias. Se muestra el test de Bonferroni para las comparaciones múltiples de los grupos del factor (Ferrán, 1996).
- Test de la t de Student (procedimiento T-TEST) para la comparación de una media en variables cuantitativas. Comparación de la medida con el valor dado por otros autores. Se asume la normalidad en los datos (Ferrán, 1996).
- Relación bivalente entre variables continuas (procedimiento CORR), con la obtención del coeficiente de correlación de Pearson. (Ferrán, 1996).

4. RESULTADOS



5.1 ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO

A continuación se exponen los datos obtenidos de los perros de nuestro estudio, divididos en tres grupos (Grupo IBD, Grupo Linfoma y Grupo DLP), referentes a edad, sexo, raza, peso y tamaño.

5.1.1 DISTRIBUCIÓN RESPECTO A LA EDAD Y EL SEXO

La media de edad de los perros incluidos en este estudio es de $7,66 \pm 3$ años, con un rango de 2 a 12 años.

La media de edad y la desviación típica para cada uno de los grupos de estudio se muestran en la tabla 8. La diferencia de edad entre los grupos de estudio no ha resultado estadísticamente significativa ($p = 0,576$).

	n	Media (años)	Desv. Típica	Valor mínimo	Valor máximo	p
Grupo IBD	15	7,17	3,46	2	12	0,0576
Grupo Linfoma	8	7,56	2,23	5	11	
Grupo DLP	9	8,55	2,87	4	14	

Tabla 8. Distribución de la edad media de los perros según sus grupos de diagnóstico.

En cuanto al sexo, los pacientes de nuestro estudio son 62,5% machos y 37,5% hembras, con un ratio de 20:12.

En los tres grupos existen más machos que hembras, aunque esta diferencia se hace más acusada en el grupo 1 (IBD), en los que encontramos un 66,7% de machos, con un ratio de 2:1. La diferencia en la distribución en cuanto al sexo en los tres grupos de estudio no ha resultado estadísticamente significativa ($p = 0,862$). La distribución en cuanto al sexo para cada uno de los grupos de estudio se muestra en el gráfico 1.

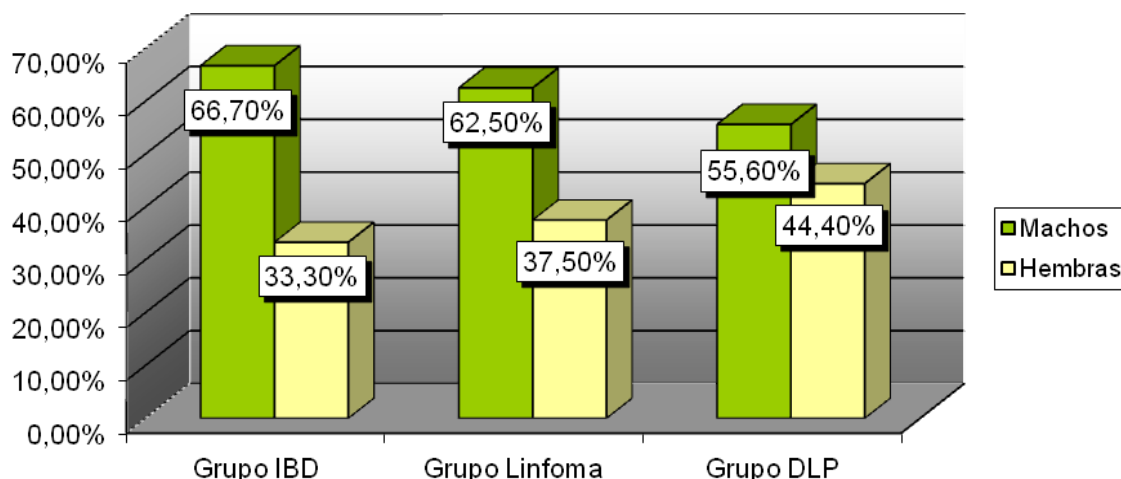


Gráfico 1. Distribución en cuanto al sexo de cada uno de los grupos de estudio.

5.1.2. DISTRIBUCIÓN RESPECTO A LA RAZA Y EL PESO

Las razas más representadas entre los perros de nuestro estudio han sido: Rottweiler ($n = 5$), Yorkshire Terrier ($n = 4$), Bóxer ($n = 3$), Cocker ($n = 3$), y Gos d'Atura catalán ($n = 2$). El resto de razas presentan un único ejemplar. Además, encontramos cuatro perros mestizos.

El peso medio de los animales de nuestro estudio es de $21,72 \pm 14,29$. La media de peso es algo mayor en el grupo Linfoma ($20,27 \pm 8,01$ kg) que en el grupo IBD ($18,16 \pm 13,42$). Sin embargo, la media de peso mayor la presenta el grupo DLP ($28,97 \pm 18,31$).

Para estudiar el peso de los animales vamos a clasificarlos en cuatro grupos (Rodríguez-Franco y col., 2002):

- Perros pequeños (<10 kg)
- Perros medianos (11-20 kg)
- Perros grandes (21-30 kg)
- Perros gigantes (>30 kg)

Encontramos una distribución muy heterogénea en cuanto al peso, siendo el 21,87% de raza pequeña, el 25% de raza mediana, el 28,13% de raza grande, y el 25% de raza gigante. Sin embargo, si comparamos el peso de los perros según el grupo al que pertenecen, observamos que el 62,5% de los perros del

grupo Linfoma son de tamaño grande, mientras que en el grupo IBD la distribución presenta porcentajes similares en cada una de las categorías establecidas (gráfico 2). El peso no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio.

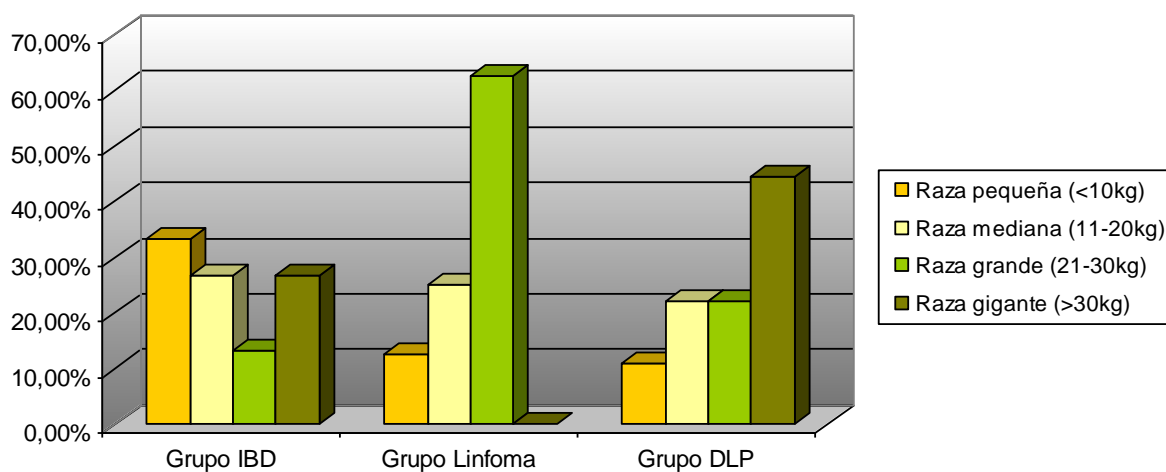


Gráfico 2. Distribución de los perros en cuanto a su tamaño para los grupos de estudio.

5.2 ESTUDIO CLÍNICO

En este apartado se van a exponer los resultados clínicos en cuanto a motivo de consulta, cuadro clínico, hallazgos en la palpación abdominal, en la analítica sanguínea y en la ecografía.

5.2.1. MOTIVOS DE CONSULTA

El motivo de consulta por el cual los propietarios de los perros de nuestro estudio acudieron a su veterinario fue la presencia de un único signo clínico en 23 de ellos (71,87%), aunque luego presentasen otros signos clínicos; o la combinación de varios de ellos en los 9 restantes (28,13%). El motivo de consulta es único o incluye varios signos clínicos independientemente del grupo de diagnóstico al que pertenecen estos animales. La presencia de diarrea fue la causa para acudir a la consulta de hasta 23 de los propietarios (71,87%), la existencia de vómitos de hasta 14 de ellos (43,75%), la pérdida de peso en 2 (6,25%) y la anorexia en uno de ellos (3,13%), en ambos casos acompañadas de algún otro signo clínico. Otros signos motivo de consulta incluyeron ataques de dolor abdominal y ascitis, en dos de los casos (6,25%).

Si analizamos los motivos de consulta en los diferentes grupos de estudio destacamos que la presencia de vómitos es algo superior a la diarrea en el grupo IBD (66,6% frente a 53,3%, del total de perros del grupo IBD), mientras que la presencia de diarrea como motivo de consulta presenta una frecuencia mucho mayor que el vómito en el grupo Linfoma (87,5% del total de perros con linfoma, frente a 37,5% en el vómito) y en el grupo DLP (88,9% frente a 11,1%, en el total de los perros de este grupo), como podemos observar en la tabla 9. Estas diferencias no tienen significación estadística.

	Grupo IBD n =15	Grupo Linfoma n = 8	Grupo DLP n = 9
Diarrea	8	7	8
Vómitos	10	3	1
Pérdida de peso	1	1	0
Alteraciones en el apetito	0	1	0
Otros	1	0	1

Tabla 9. Motivos de consulta tanto en su aparición de manera individual como formando parte de un conjunto de signos clínicos, en los diferentes grupos de estudio.

Mediante diferentes análisis estadísticos, tablas de contingencia y pruebas de Chi-cuadrado, tratamos de buscar un posible efecto del tamaño, el sexo o la edad en el motivo de consulta en nuestra población. Ha resultado estadísticamente significativo el que los animales de tamaño pequeño (<10kg) presentaran con mayor frecuencia el vómito como motivo de consulta, y con menor frecuencia la diarrea, respecto al resto de animales ($p = 0,026$).

5.2.2. SIGNOS CLÍNICOS

5.2.2.1 SIGNOS CLÍNICOS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

El signo clínico más frecuente es la pérdida de peso, presente en 31 de los 32 perros (96,87%), seguida de diarrea, alteraciones en la actividad o actitud, alteraciones en el apetito, y vómitos. La **pérdida de peso** se consideró leve (< 5%) en 12 de los casos, moderada (5-10%) en 13 de los casos, y grave (> 10%) en 6 de ellos.

Destacamos también la presencia la diarrea, crónica, con características de intestino delgado, en 26 de los 32 perros (81,25%). En estos casos la frecuencia de la defecación era normal con una consistencia blanda en 8 de los animales, mientras que 13 presentaban entre 4 y 6 deposiciones al día o bien heces muy blandas, y los 4 restantes más de 6 deposiciones al día y/o diarrea líquida.

Las alteraciones en el apetito, presentes en 18 de los 32 perros (56,25%) incluyeron fundamentalmente disminución del apetito ($n = 15$), y con menor frecuencia apetito aumentado ($n = 4$). El grado de alteraciones del apetito fue leve en seis de los casos, moderado en cinco y grave en seis.

La presencia de vómitos fue también muy frecuente, presentándose en 17 de los perros (53,13%). La frecuencia de aparición era de 1 vómito a la semana en 5 de los casos; de 2 o 3 vómitos a la semana en cuatro casos; y de más de tres vómitos por semana en 8 de ellos.

5.2.2.2 SIGNOS CLÍNICOS POR GRUPOS DE ESTUDIO E ÍNDICE DE ACTIVIDAD CLÍNICA

Al estudiar los signos clínicos en los tres grupos observamos algunas diferencias. La pérdida de peso es el síntoma más frecuente entre los perros diagnosticados de IBD, presente en la totalidad de ellos. Sin embargo, en el grupo Linfoma este síntoma comparte frecuencia con la diarrea; y en el grupo DLP la diarrea es ligeramente más frecuente que la pérdida de peso, y aparece en todos los perros de este grupo. La diferencia más llamativa la encontramos en la presencia de vómitos, notablemente más frecuentes en el grupo IBD, donde constituyen el segundo signo más común, mientras que en los grupos Linfoma y DLP es el signo menos frecuente de los estudiados. Por otro lado, las alteraciones en el apetito son más frecuentes en el grupo Linfoma que en el resto de grupos. Los resultados en cuanto a sintomatología para los tres grupos de estudio se muestran en la tabla 10.

	Grupo IBD n = 15	Grupo Linfoma n = 8	Grupo DLP n = 9
Pérdida de peso	100,0%	87,5%	88,9%
Diarrea	66,7%	87,5%	100,0%
Alteraciones en la actividad/actitud	73,3%	75,0%	77,8%
Alteraciones en el apetito	60,0%	75,0%	44,4%
Vómitos	80,0%	37,5%	22,2%

Tabla 10. Valoración de la sintomatología clínica según los grupos de diagnóstico. Los porcentajes se refieren al total de individuos dentro de cada grupo de diagnóstico.

Las diferencias en la frecuencia de vómitos y el número de deposiciones al día y la consistencia de las heces, así como el grado de pérdida de peso y de alteraciones del apetito entre los distintos grupos de estudio no han resultado estadísticamente significativas.

La gravedad de cada signo clínico nos ha servido para calcular un índice de actividad, como se puede observar en la tabla 12. En el grupo Linfoma el índice de actividad clínica medio ha sido mayor que en los otros dos grupos, sin llegar a ser esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,432$), con los valores que se muestran en la tabla 11.

	n	Índice Actividad Medio	Desviación Típica	p
Grupo IBD	15	6,4	2,6	0,432
Grupo Linfoma	8	8,0	3,6	
Grupo DLP	9	6,0	3,1	

Tabla 11. Índice de actividad clínica medio para cada uno de los grupos de estudio.

	Caso	Vómitos	Diarrea	Pérdida de peso	Alteración del apetito	Alteración en la actividad/actitud	ÍNDICE DE ACTIVIDAD CLÍNICA
Grupo IBD	1	1	3	3	0	1	8
	3	2	1	3	1	2	9
	10	3	2	2	0	2	9
	11	3	0	1	0	0	4
	12	2	1	1	0	1	5
	13	0	2	1	0	0	3
	14	0	0	2	0	0	2
	15	1	2	1	1	2	7
	17	2	2	1	0	1	6
	18	1	0	2	1	1	5
	19	1	2	2	2	2	9
	20	3	3	2	1	1	10
	27	3	0	1	3	3	10
	29	3	0	1	0	1	5
	32	0	2	2	0	0	4
Grupo Linfoma	4	0	2	1	3	0	6
	5	1	0	2	1	1	5
	6	0	2	3	2	1	8
	7	2	2	2	2	2	10
	8	0	3	2	3	2	10
	9	3	2	3	3	3	14
	23	0	1	1	0	0	2
	31	0	1	3	3	2	9
Grupo DLP	2	3	3	3	3	2	14
	16	0	3	2	0	1	6
	21	0	1	0	0	0	1
	22	0	1	2	2	2	7
	24	0	1	1	0	1	3
	25	0	1	1	0	0	2
	26	3	2	2	1	1	9
	28	0	2	2	2	2	8
	30	0	2	1	0	1	4

Tabla 12. Índice de actividad clínica y gradación de los síntomas de todos los casos según su grupo de estudio.

5.2.3 PALPACIÓN ABDOMINAL

Los hallazgos más relevantes encontrados en la palpación abdominal se resumen en el gráfico 3, y se comentan a continuación.

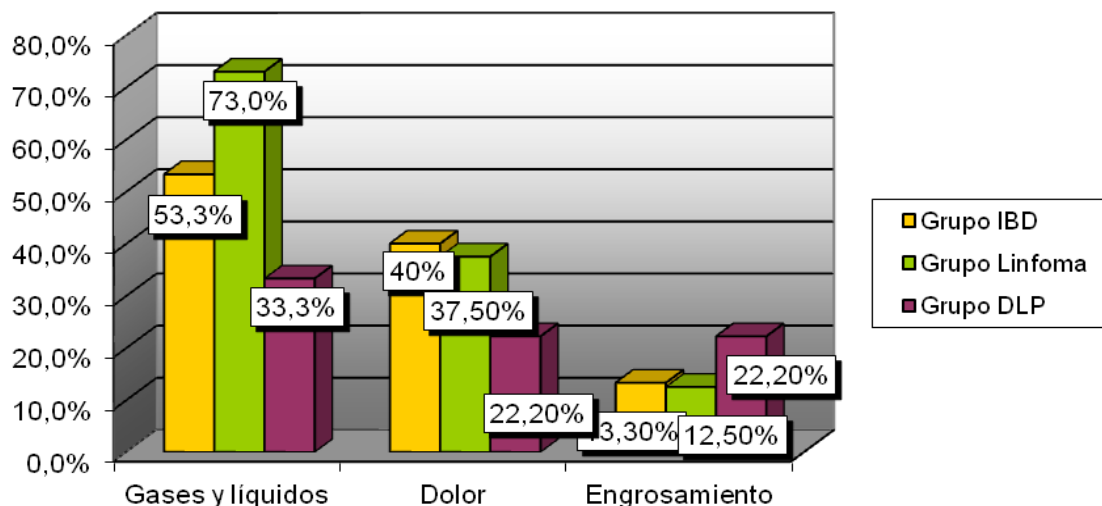


Gráfico 3. Hallazgos más relevantes en la palpación abdominal: presencia de gases y líquidos en el interior de las asas intestinales, dolor, y engrosamiento de las asas intestinales, para los tres grupos de estudio. Los porcentajes se refieren al total de animales de cada grupo.

La palpación abdominal reveló la presencia de gases y líquidos en interior de las asas intestinales en el 53,1% de los perros. Al analizar este parámetro en los grupos de estudio, encontramos su presencia más frecuente en el grupo Linfoma, si bien las diferencias entre grupos no alcanza la significación estadística ($p = 0,228$). Los resultados de la palpación de gases y líquidos en las asas intestinales en los diferentes grupos de estudio se muestran en el gráfico 3.

En once de los animales (34,4%) se percibió dolor a la palpación abdominal. El dolor abdominal estaba también presente en los tres grupos de estudio (gráfico 3) y, aunque era ligeramente más frecuente en el grupo IBD, las diferencias no han resultado estadísticamente significativas ($p = 0,659$).

La sensación de engrosamiento de las asas intestinales fue apreciada en la palpación abdominal en el 15,6% ($n = 5$) de los perros, afectando a los tres grupos de estudio, y no resultando las diferencias entre grupos estadísticamente significativas ($p = 0,205$). Los resultados de estos parámetros pueden verse en el gráfico 3.

5.2.4. ANALÍTICA SANGUÍNEA

Los hallazgos más relevantes de la analítica sanguínea, tanto del hemograma como de la bioquímica, para cada grupo de estudio se resumen en el gráfico 4, y se van a comentar a continuación.

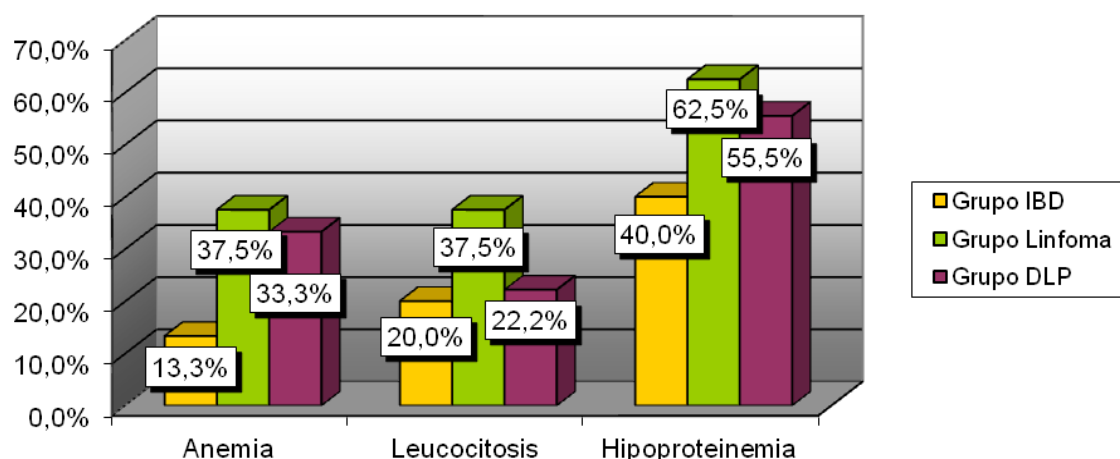


Gráfico 4. Alteraciones encontradas en la analítica sanguínea para cada grupo de estudio. Los porcentajes se refieren al total de animales dentro de cada grupo.

5.2.4.1 HEMOGRAMA

Los valores de hematocrito se encontraron por debajo de los límites de normalidad, indicando la presencia de anemia, en el 25% de los perros del estudio ($n = 8$). La anemia apareció en perros de los tres grupos de estudio, siendo más frecuente en el grupo Linfoma (37,5%), que el grupo DLP (33,3%) y, fundamentalmente, que en el grupo IBD (13,3%), aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas entre grupos ($p = 0,352$).

Se han realizado análisis estadísticos de t de Student tratando de relacionar los hallazgos de la analítica sanguínea con la sintomatología clínica en la población estudiada, encontrándose diferencias significativas en el hematocrito entre los casos que presentan una pérdida de peso leve y los que presentan una pérdida de peso moderada o grave ($p < 0,001$). Asimismo, existen diferencias estadísticamente significativas en el hematocrito entre los perros que no presentan alteraciones en la actividad/actitud y los que presentan alteraciones de carácter moderado o grave ($p = 0,011$).

Utilizando el índice de correlación de Pearson, se ha encontrado una correlación negativa entre el hematocrito y el índice de actividad clínico. Es decir, el descenso en los valores de hematocrito se ha correlacionado con un mayor índice de actividad clínico ($r = -0,470$; $p = 0,007$).

En cuanto al valor de los leucocitos, encontramos leucocitosis en el 25% de los perros ($n = 8$). En todos los casos se trataba de una leucocitosis con neutrofilia. Aparece leucocitosis en los tres grupos de estudio, aunque es más frecuente en el grupo Linfoma (37,5%), que en el grupo DLP (22,2%) y que en el grupo IBD (20%), sin llegar a ser estas diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,636$).

5.2.4.2 BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

El hallazgo más frecuente en la analítica sanguínea es la presencia de hipoproteinemia, que afectó a 16 de los casos (50%), 6 del grupo IBD, 5 del grupo Linfoma y 5 del grupo DLP. La hipoproteinemia presentaba un cociente albúmina/globulinas en torno a 1 en todos los casos. Así, si observamos este parámetro en cuanto a porcentaje para cada grupo de estudio, se dio de manera más frecuente en el grupo Linfoma (62,5%), seguido del grupo DLP (55,5%), y siendo menos frecuente en el grupo IBD (40%). Las diferencias entre grupos no han resultado estadísticamente significativas ($p = 0,546$).

Los valores de hipoproteinemia han presentado diferencias significativas entre los perros de la población que presentaban una pérdida de peso leve y los que presentaban una pérdida de peso moderada y grave ($p = 0,013$).

El resto de los parámetros de la bioquímica sanguínea se encontraban dentro del rango de normalidad en todos los perros, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos.

5.2.5 ECOGRAFÍA ABDOMINAL

La ecografía abdominal reveló la presencia de un engrosamiento de la pared de intestino delgado en el 46,9% de los perros del estudio ($n = 15$). Además, en seis de los casos con engrosamiento de la pared intestinal (18,8% del total de perros), había una pérdida de diferenciación de las capas de la pared

de intestino delgado. Encontramos linfadenopatías mesentéricas en sólo el 15,6% de los animales ($n = 5$).

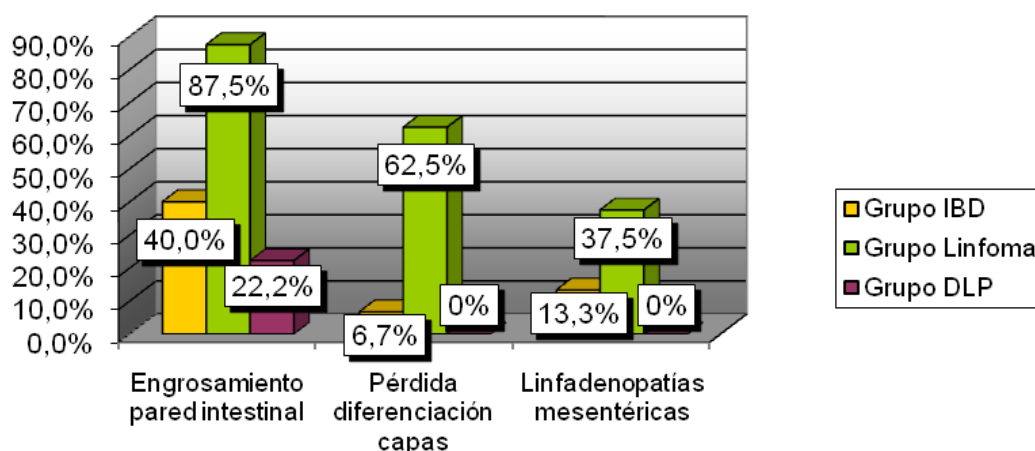


Gráfico 5. Hallazgos en la ecografía abdominal para cada uno de los grupos de estudio. Los porcentajes se refieren al total de animales de cada grupo.

Si analizamos estos resultados comprobamos que los tres parámetros ecográficos están presentes tanto en el grupo IBD como en el grupo Linfoma, pese a que ninguno de los animales del grupo DLP presenta pérdida de diferenciación de capas o linfadenopatías mesentéricas. La presencia de alteraciones en la ecografía abdominal es más frecuente en el grupo Linfoma que en el grupo IBD en todos los parámetros estudiados, especialmente en la pérdida de diferenciación de capas de la pared intestinal, que sólo está presente en uno de los perros del grupo IBD.

Las diferencias entre grupos para algunos de estos parámetros han resultado estadísticamente significativas. Para comprobar las diferencias se ha realizado una prueba de Chi-cuadrado, para contrastar las diferencias de porcentajes de ausencia o presencia de los distintos parámetros en los tres grupos de estudio. En cada grupo se observa un residual ajustado estandarizado que nos permite contrastar si la frecuencia observada es superior o inferior a la esperada (tabla 13). La presencia de engrosamiento de la pared intestinal es significativamente más elevada en el grupo Linfoma, mientras que en los otros dos grupos esta presencia es más baja ($p = 0,020$). La pérdida de diferenciación de capas intestinales es también significativamente más frecuente en el grupo Linfoma ($p = 0,001$).

		ENGROS PARED ID		Total	PÉRDIDA CAPAS		Total	
		ausencia	presencia		ausencia	presencia		
GRUPO	Linfoma	n	1	7	8	3	5	8
		Porcentaje	12,5%	87,5%	100,0%	37,5%	62,5%	100,0%
		Residuos corregidos	-2,7	2,7		-3,7	3,7	
	IBD	n	9	6	15	14	1	15
		Porcentaje	60,0%	40,0%	100,0%	93,3%	6,7%	100,0%
		Residuos corregidos	0,7	-0,7		1,6	-1,6	
	DLP	n	7	2	9	9	0	9
		Porcentaje	77,8%	22,2%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%
		Residuos corregidos	1,7	-1,7		1,7	-1,7	
Total	n	17	15	32	26	6	32	
	Porcentaje	53,1%	46,9%	100,0%	81,3%	18,8%	100,0%	

p = 0,020

p = 0,001

Tabla 13. Diferencias estadísticamente significativas entre grupos para los parámetros ecográficos estudiados.

5.3 ESTUDIO ENDOSCÓPICO

En este apartado se van a exponer los hallazgos de la exploración endoscópica del aparato digestivo superior, prestando especial atención al intestino delgado, objeto de nuestro estudio.

5.3.1 HALLAZGOS ENDOSCÓPICOS EN INTESTINO DELGADO EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Todos los animales presentaron alteraciones observables en la endoscopia digestiva. Estos animales mostraban una mucosa intestinal de aspecto engrosado macroscópicamente, siendo este engrosamiento de grado intenso en 16 de los animales (50%). La mucosa intestinal aparecía además irregular en el 90,6% de los perros ($n = 29$), y en el 34,4% de los casos ($n = 11$) era un aspecto irregular de grado intenso. En todos los perros menos en uno (96,9%) la mucosa intestinal tenía un aspecto congestivo, de grado intenso en el 34,4% ($n = 11$).

A la toma de biopsias, la mucosa tenía una consistencia friable en el 56,25% ($n = 18$) de los perros, y dura en tan solo cinco de ellos (15,6%). Encontramos soluciones de continuidad en la mucosa intestinal en el 50% de los animales, de grado intenso en el 15,6% de ellos ($n = 5$); y puntos blancos en el 21,9% de los animales ($n = 6$).

Con el fin de conocer si existe algún tipo de relación entre los parámetros endoscópicos y la clínica de los animales se han realizado diversos análisis de varianza y pruebas de chi-cuadrado. Se han encontrado diferencias significativas en el índice de actividad clínica entre los casos con presencia de mucosa de consistencia dura a la toma de biopsias y los que presentaban ausencia de este parámetro, como puede verse en la tabla 14.

	n	Media índice de actividad	Desviación Típica	p
Mucosa de consistencia dura				
Ausencia	27	5,96	2,81	0,003
Presencia	5	10,60	3,43	

Tabla 14. Diferencias significativas en el índice de actividad clínica, según la presencia o ausencia de mucosa dura a la toma de biopsias.

Asimismo, los parámetros endoscópicos han presentado diferencias significativas según la pérdida o conservación de la diferenciación de capas a nivel ecográfico. Los perros que presentaban pérdida de diferenciación de capas a nivel ecográfico presentaban significativamente en menor medida una mucosa friable a la toma de biopsias ($p = 0,002$), como puede observarse en la tabla 15. Concretamente, en ninguno de los casos en que la mucosa tenía una consistencia friable a la toma de biopsias, encontramos una pérdida de diferenciación de capas en la ecografía. Además, también hemos hallado una relación con la presencia de soluciones de continuidad, de manera que, en los casos en que las soluciones de continuidad eran de grado intenso, era significativamente más frecuente la pérdida de diferenciación de capas ($p = 0,036$), como se refleja en la tabla 15.

		FRIABLE		Total	SOLUCIONES CONTINUIDAD			Total
		ausencia	presencia		ausencia	presencia	mucha presencia	
PÉRDIDA CAPAS	ausencia n	8	18	26	14	10	2	26
	Porcentaje	30,8%	69,2%	100%	53,8%	38,5%	7,7%	100%
	Residuos corregidos	-3,1	3,1		0,9	1	-2,6	
	presencia n	6	0	6	2	1	3	6
	Porcentaje	100,0%	0,0%	100%	33,3%	16,7%	50,0%	100%
	Residuos corregidos	3,1	-3,1		-0,9	-1	2,6	
Total n		14	18	32	16	11	5	32
Porcentaje		43,8%	56,3%	100%	50,0%	34,4%	15,6%	100%

$p = 0,002$

$p = 0,036$

Tabla 15. Diferencias significativas en la presencia de mucosa friable o de soluciones de continuidad observadas durante la endoscopia, según la conservación o pérdida de diferenciación de capas en la ecografía.

5.3.2 HALLAZGOS ENDOSCÓPICOS EN INTESTINO DELGADO POR GRUPOS DE ESTUDIO

Si analizamos los hallazgos endoscópicos para cada uno de los grupos de estudio observamos que, en el caso de mucosa engrosada, mucosa irregular, y mucosa congestiva, las lesiones son de grado intenso con mayor frecuencia en el grupo Linfoma que en el grupo IBD. Sin embargo, encontramos lesiones de grado intenso en los tres grupos de estudio, y las diferencias entre grupos no alcanzan la significación estadística. Los resultados de estos parámetros de grado intenso para cada grupo de estudio se muestran en el gráfico 6.

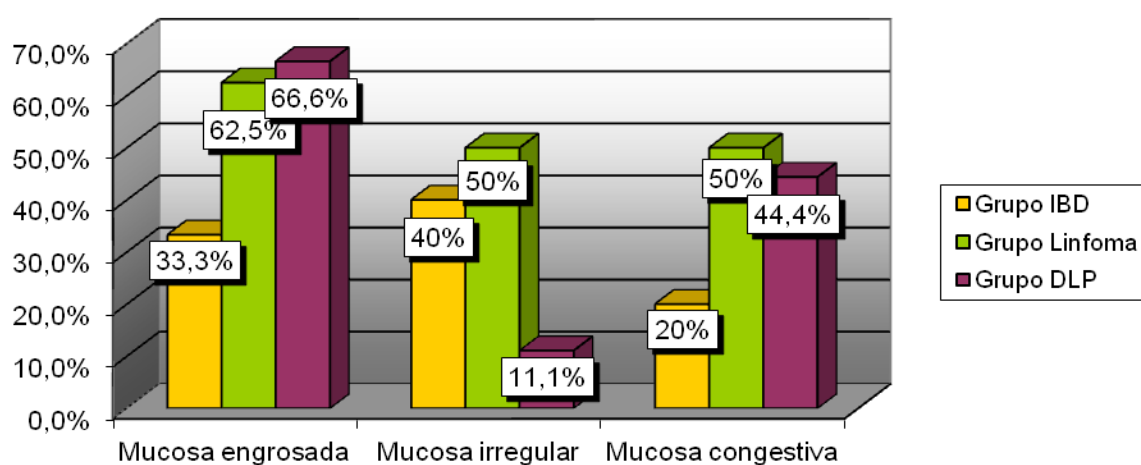


Gráfico 6. Parámetros de grado intenso en cuanto al aspecto macroscópico de la mucosa intestinal para cada uno de los grupos de estudio. Los porcentajes se refieren al total de animales dentro de cada grupo.

La consistencia de la mucosa a la toma de biopsias es muy frecuentemente friable entre los casos del grupo IBD (73, 3%), hallazgo mucho menos frecuente entre los casos del grupo Linfoma (12,5%) (gráfico 7). La ausencia de mucosa friable es estadísticamente significativa en el grupo Linfoma, respecto a los otros dos grupos ($p = 0,015$), como se muestra en la tabla 16. Sin embargo, entre los casos del grupo Linfoma, un 44,4% de los casos presentan una mucosa dura a la toma de biopsias, hallazgo que no se encuentra en ninguno de los casos del grupo IBD (gráfico 7). La presencia de una mucosa dura a la toma de biopsias es estadísticamente significativa en los casos del grupo Linfoma, mientras que su ausencia lo es en el grupo IBD ($p = 0,006$), como puede verse en la tabla 16. Para comprobar las diferencias entre grupos en estos parámetros se ha realizado una prueba de Chi-cuadrado, para contrastar las diferencias de porcentajes de ausencia o presencia de mucosa friable o dura en los tres grupos de estudio. En cada grupo se observa un

residual ajustado estandarizado que nos permite contrastar si la frecuencia observada es superior o inferior a la esperada (tabla 16).

			FRIABLE		Total	DURA		Total
			ausencia	presencia		ausencia	presencia	
GRUPO	Linfoma	n	7	1	8	4	4	8
		Porcentaje	87,5%	12,5%	100,0%	50,0%	50,0%	100,0%
		Residuos corregidos	2,9	-2,9		-3,1	3,1	
	IBD	n	4	11	15	15	0	15
		Porcentaje	26,7%	73,3%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%
		Residuos corregidos	-1,8	1,8		2,3	-2,3	
	DLP	n	3	6	9	8	1	9
		Porcentaje	33,3%	66,7%	100,0%	88,9%	11,1%	100,0%
		Residuos corregidos	-0,7	0,7		0,4	-0,4	
Total	n	14	18	32	27	5	32	
	Porcentaje	43,8%	56,3%	100,0%	84,4%	15,6%	100,0%	
			p = 0,015				p = 0,006	

p = 0,015

p = 0,006

Tabla 16. Diferencias significativas entre grupos en los parámetros consistencia de la mucosa friable y consistencia de la mucosa dura a la toma de biopsias.

En los tres grupos de estudio nos encontramos con la presencia de soluciones de continuidad en la mucosa intestinal, aunque aparecen de manera más frecuente en el grupo Linfoma que en el resto de grupos. La presencia de puntos blancos, sin embargo, es más frecuente en el grupo DLP, seguido del grupo Linfoma, y mucho menos frecuente en el grupo IBD (gráfico 7). Las diferencias entre grupos para estos parámetros no han resultado significativas al 95% de confianza.

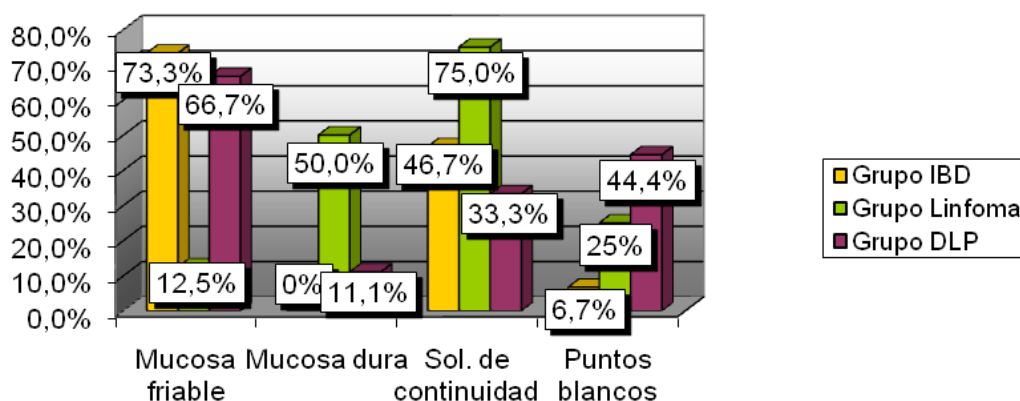


Gráfico 7. Consistencia de la mucosa a la toma de biopsias (dura o friable) y alteraciones visibles (soluciones de continuidad y puntos blancos) para los tres grupos de estudio. Los porcentajes se refieren al total de perros de cada grupo.

El índice de alteraciones endoscópicas ha sido mayor en el grupo Linfoma que en los otros dos grupos, aunque las diferencias no han alcanzado la significación estadística, como puede verse en la tabla 17.

	n	Índice Medio	Desviación Típica	p
Grupo IBD	15	5,07	1,53	0,545
Grupo Linfoma	8	5,75	1,28	
Grupo DLP	9	5,22	1,30	

Tabla 17. Índice de alteraciones endoscópicas por grupo de estudio.

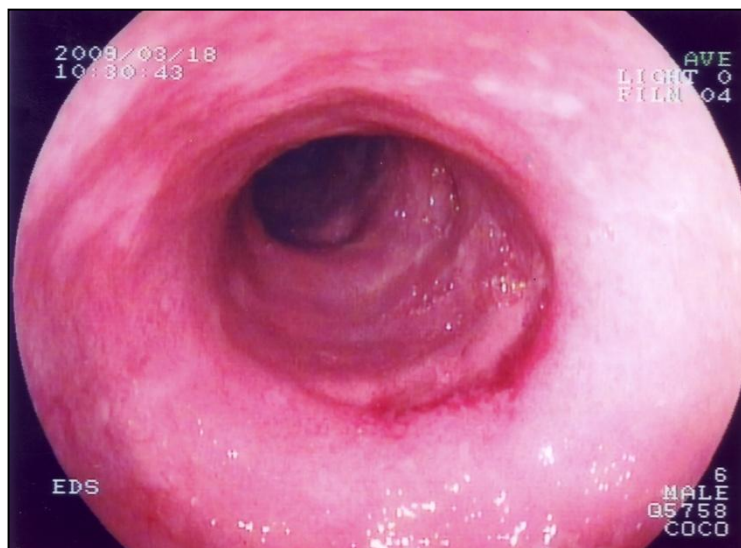


Figura 8. Caso 15, Grupo IBD. Mucosa engrosada (grado 1), irregular (grado 1), congestiva (grado 2) y con presencia de soluciones de continuidad (grado 1).



Figura 9. Caso 14. Grupo IBD. Mucosa engrosada (grado 2), irregular (grado 2) y congestiva (grado 2).



Figura 10. Caso 19. Grupo IBD. Mucosa engrosada (grado 2), irregular (grado 1), congestiva (grado 2) y con presencia de soluciones de continuidad (grado 1).

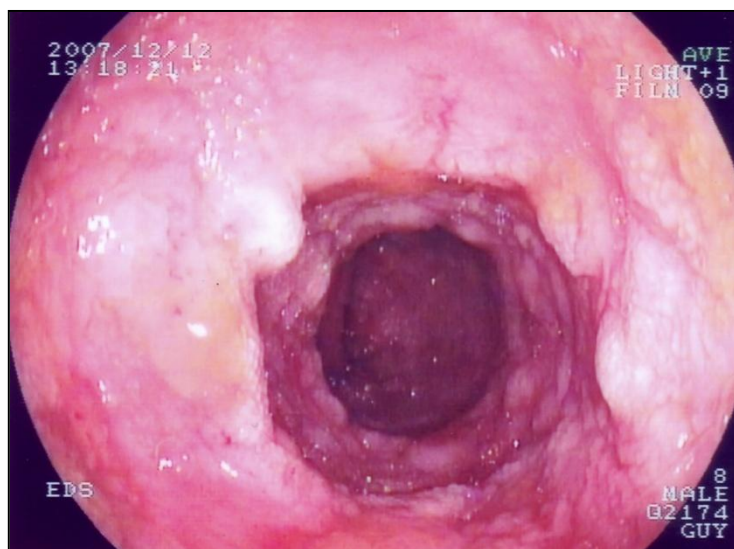


Figura 11. Caso 4. Grupo Linfoma. Mucosa engrosada (grado 2), irregular (grado 2), congestiva (grado 1) y con presencia de soluciones de continuidad (grado 1).

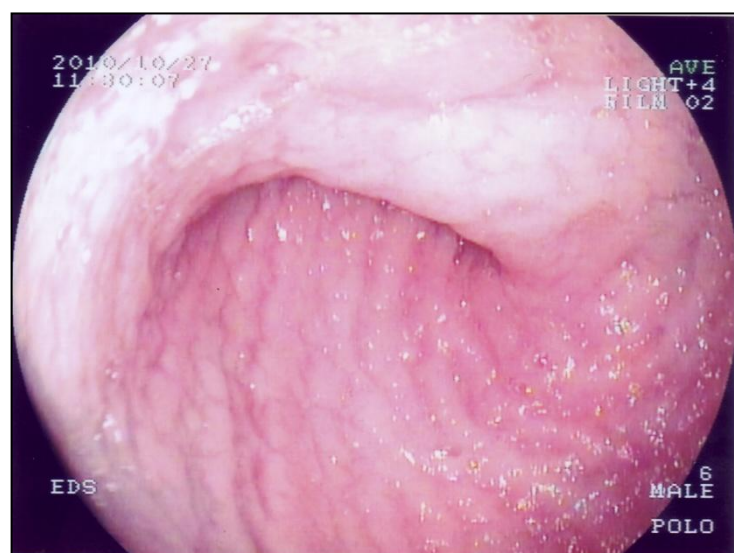


Figura 12. Caso 31. Grupo Linfoma. Mucosa engrosada (grado 1) e irregular (grado 1).



Figura 13. Caso 6. Grupo Linfoma. Mucosa engrosada (grado 1), irregular (grado 1), congestiva (grado 2), con presencia de soluciones de continuidad (grado 2) y puntos blancos (grado 1).

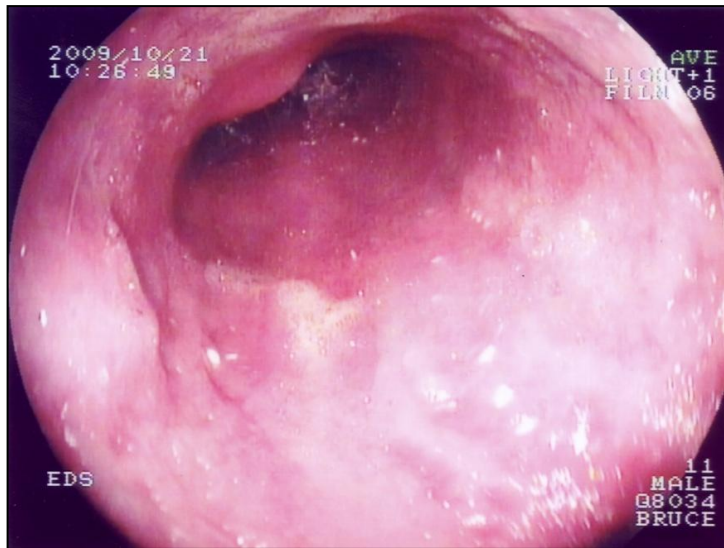


Figura 14. Caso 16. Grupo DLP. Mucosa engrosada (grado 2), irregular (grado 1) congestiva (grado 1), y con presencia de puntos blancos (grado 1).



Figura 15. Caso 24. Grupo DLP. Mucosa engrosada (grado 1), congestiva (grado 1), y con presencia de puntos blancos (grado 2).

5.4 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

A continuación se van a exponer los resultados obtenidos tras el estudio de las biopsias endoscópicas de duodeno de nuestros perros bajo el microscopio óptico. Los parámetros establecidos en el material y métodos se han dividido en los publicados por la WSAVA (Day y col., 2008) y otros parámetros de interés, algunos de ellos sólo evaluables en los casos de linfoma intestinal. Dado que todos nuestros casos de linfoma se acompañan de un infiltrado inflamatorio asociado al proceso neoplásico, hecho que dificulta el diagnóstico, hemos considerado interesante estudiar, en la medida de lo posible, todos los parámetros en todas las muestras, para poder establecer comparaciones.

5.4.1 PARÁMETROS DE LA WSAVA

En este apartado analizaremos los parámetros publicados por el grupo de estandarización gastrointestinal de la WSAVA (World Small Animal Veterinary Association; Day y col., 2008) para el diagnóstico de la inflamación intestinal en biopsias endoscópicas caninas. Para su valoración se ha tenido en cuenta, únicamente, la observación de las muestras con la tinción de hematoxilina-eosina y, excepcionalmente, en el caso de fibrosis en la lámina propia, se ha utilizado la tinción de tricrómico de Masson, manteniendo los criterios que establece la WSAVA.

Los resultados del análisis de estos parámetros para los tres grupos de estudio se muestran en la tabla 18.

	Caso	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9
Grupo IBD	1	2	2	1	2	1	2	2	0	2
	3	1	0	1	0	1	0	3	0	0
	10	1	2	3	0	0	0	2	0	2
	11	2	0	1	0	0	1	2	0	1
	12	2	0	1	2	0	0	2	0	1
	13	1	0	0	0	1	0	2	0	0
	14	1	0	2	2	1	2	3	0	0
	15	1	0	0	0	0	0	2	0	0
	17	2	1	0	0	1	0	3	1	1
	18	1	0	0	0	0	0	2	0	0
	19	2	0	2	1	2	1	2	0	0
	20	1	1	0	0	1	0	3	0	1
	27	1	0	1	0	0	1	2	0	1
	29	0	0	1	1	0	1	3	2	1
	32	1	1	1	1	1	1	3	2	1
Grupo Linfoma	4	2	2	2	1	1	1	3	0	0
	5	1	0	1	1	0	0	3	0	2
	6	3	3	1	1	1	1	2	0	0
	7	3	3	3	1	1	3	1	0	0
	8	3	2	2	0	1	2	2	0	0
	9	2	2	1	0	0	3	2	0	0
	23	2	1	0	0	0	3	3	0	1
	31	2	2	0	1	2	3	3	0	2
Grupo DLP	2	2	0	2	1	0	0	3	1	2
	16	1	0	0	2	0	3	3	0	0
	21	1	1	0	1	0	3	2	0	1
	22	1	1	0	1	0	1	2	0	0
	24	1	0	0	0	0	1	2	0	1
	25	2	1	0	0	0	0	3	0	0
	26	1	0	0	0	0	1	2	0	0
	28	1	1	1	0	0	2	2	0	0
	30	1	1	1	1	1	3	3	0	1

Tabla 18. Valoración de los parámetros histopatológicos de la WSAVA en el duodeno de los perros de los tres grupos de estudio (n = 32). W1: acortamiento-ensanchamiento de vellosidades; W2: lesión epitelial; W3: dilatación de las criptas; W4: dilataciones linfáticas; W5: fibrosis; W6: linfocitos intraepiteliales; W7: infiltrado de linfocitos y células plasmáticas en lámina propia; W8: infiltrado de eosinófilos en lámina propia; W9: infiltrado de neutrófilos en lámina propia. Grados: 0 = mucosa normal; 1 = lesión leve; 2 = lesión moderada; 3 = lesión intensa.

Como se refleja en la tabla anterior, todos los perros presentan alteraciones importantes en los parámetros que establece la WSAVA para la

enfermedad inflamatoria crónica de intestino delgado. A continuación evaluaremos cada uno de ellos.

En cuanto al **acortamiento-ensanchamiento de las vellosidades intestinales** destacamos que está presente en casi todos los casos. Este parámetro, es más intenso en el grupo Linfoma, en el que existe un predominio de la lesión moderada frente a la lesión leve, y varios casos de grado intenso. Sin embargo, en los grupos IBD y DLP, predomina el grado leve. Las diferencias son estadísticamente significativas en el grupo Linfoma para el grado intenso del parámetro, más frecuente que en los otros grupos; y para el grado leve, menos frecuente que en los otros grupos ($p = 0,022$).

La presencia de **lesión epitelial** es también más frecuente en el grupo Linfoma (87,5%) que en el grupo IBD (33,3%) y en el grupo DLP (55,6%). Además presenta una mayor frecuencia el grado moderado o intenso en el grupo Linfoma que en los grupos IBD y DLP, en los cuales predomina el grado leve, diferencia que resulta estadísticamente significativa ($p = 0,004$).

Existen diferencias destacables en cuanto a la presencia de **linfocitos intraepiteliales**, observándose en la mayoría de los casos (87,5%) del grupo Linfoma, mientras que en el grupo IBD están presentes en el 46,7% de los casos. Además, en el 50% de perros del grupo Linfoma se considera una presencia de linfocitos intraepiteliales de grado intenso, mientras que en el grupo IBD sólo encontramos lesiones de grado moderado. En el grupo DLP la presencia de linfocitos intraepiteliales en el 77,8% de los perros, considerándose de grado intenso en el 33,3% del total de perros de este grupo. Los linfocitos intraepiteliales se estudian en profundidad más adelante.

Por otro lado, la presencia de un **infiltrado de eosinófilos** en lámina propia es más frecuente en los casos del grupo IBD que en los casos del grupo DLP, con porcentajes del 20 y el 11,1% respectivamente, y no está presente en ninguno de los casos del grupo Linfoma. La **presencia de neutrófilos** revela, por el contrario, resultados algo más graves en el grupo Linfoma que en el grupo IBD, con porcentajes de 87,5 y 60% respectivamente. En el grupo DLP la presencia de un infiltrado de neutrófilos en lámina propia se limita al 44,4% de los casos. Estas diferencias entre grupos no tienen significación estadística.

Como puede observarse en la tabla 18, para los parámetros de dilatación de criptas, dilataciones linfáticas, fibrosis e infiltrado de linfocitos y células

plasmáticas en lámina propia, los resultados son similares para los grupos IBD y Linfoma, aunque ligeramente más graves en este último.

Se ha calculado el **índice de gravedad de la lesión inflamatoria duodenal a nivel histopatológico**, que ha sido superior en el grupo Linfoma que en los otros dos grupos, siendo las diferencias estadísticamente significativas, como puede observarse en las tablas 20 y 21.

	n	Índice Medio	Desviación Típica	p
Grupo IBD	15	7,93	3,24	0,005
Grupo Linfoma	8	12,98	3,38	
Grupo DLP	9	7,67	2,74	

Tabla 20. Índice de gravedad de la lesión inflamatoria duodenal nivel histopatológico por grupo de estudio. Valor de p obtenido de la tabla de ANOVA.

Variable dependiente	(I) GRUPO	(J) GRUPO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	p	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
ÍNDICE WSAVA	linfoma	IBD	4,442*	1,377	0,009	0,94	7,94
		DLP	4,708*	1,528	0,013	0,83	8,59
	IBD	linfoma	-4,442*	1,377	0,009	-7,94	-,94
		DLP	0,267	1,326	1,000	-3,10	3,64
	dudoso	linfoma	-4,708*	1,528	0,013	-8,59	-,83
		IBD	-0,267	1,326	1,000	-3,64	3,10

Tabla 21. Índice de gravedad de la lesión inflamatoria duodenal nivel histopatológico por grupo de estudio. Test de Bonferroni para comprobar entre qué grupos es significativa la diferencia.

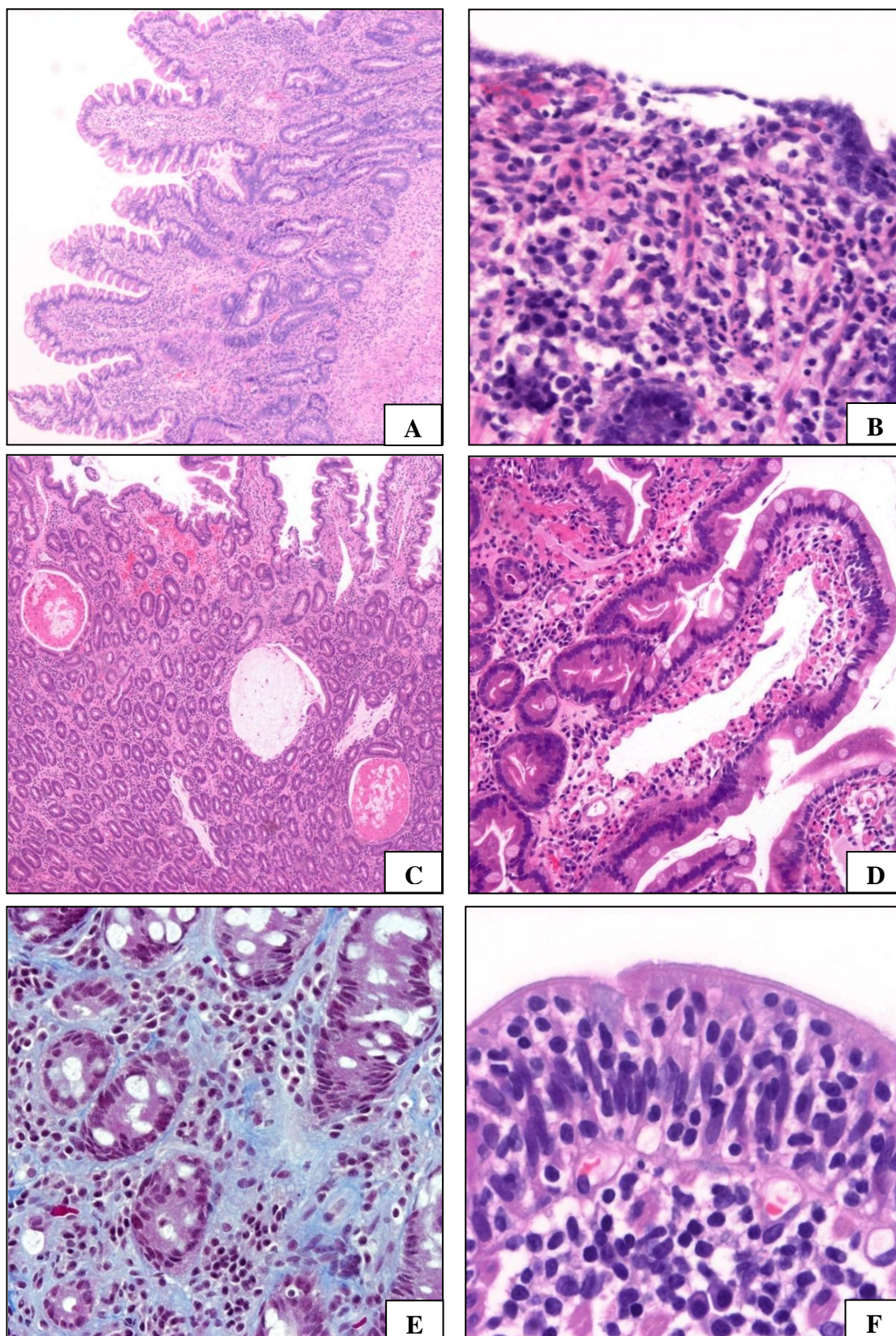


Figura 16. Parámetros de la WSAVA **A.** Acortamiento-ensanchamiento de vellosidades grado 2, H-E x 4 **B.** Lesión epitelial grado 3, e infiltrado de neutrófilos en lámina propia grado 1, H-E x 20. **C.** Dilatación de las criptas grado 2, H-E x 4. **D.** Dilataciones linfáticas grado 1, H-E x 10. **E.** Fibrosis grado 2, tricrómico de Masson x 20. **F.** Linfocitos intraepiteliales grado 3, H-E x 40.

5.4.1.1 RELACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA WSAVA CON LOS HALLAZGOS CLÍNICOS Y ENDOSCÓPICOS

Existen diferencias significativas en el **índice de gravedad de la lesión inflamatoria duodenal a nivel histopatológico** entre los animales que tienen alteraciones leves del apetito y los que tienen moderadas o graves ($p = 0,003$). También se ha encontrado una asociación significativa entre el índice de gravedad de la lesión inflamatoria y el parámetro endoscópico mucosa de consistencia dura a la toma de biopsias, como puede observarse en la tabla 21.

	n	Media índice gravedad histopatológico	Desviación Típica	p
Mucosa de consistencia dura				
Ausencia	27	8,26	3,46	0,008
Presencia	5	12,80	1,79	

Tabla 21. Diferencias significativas en el índice de gravedad de la lesión inflamatoria duodenal a nivel histopatológico, según la presencia o ausencia de mucosa de consistencia dura a la toma de biopsias.

Hemos encontrado una asociación significativa entre el engrosamiento de la pared intestinal a nivel ecográfico y la lesión epitelial de grados moderado e intenso ($p = 0,002$). La pérdida de diferenciación de capas en la ecografía también se ha asociado significativamente con la lesión epitelial de grado intenso ($p = 0,008$), y con el acortamiento-ensanchamiento de vellosidades intestinales ($p = 0,002$).

Por otro lado, en cuanto a los parámetros endoscópicos, la presencia de una mucosa dura a la toma de biopsias se ha relacionado también con una lesión epitelial de grado moderado e intenso ($p = 0,008$) y con un infiltrado intenso de neutrófilos ($p = 0,022$).

5.4.2 OTROS PARÁMETROS NO WSAVA EVALUADOS EN TODOS LOS CASOS

Además de los parámetros establecidos por la WSAVA, se ha estudiado el infiltrado de células redondas, su patrón y distribución en la lámina propia, así como la presencia de linfocitos intraepiteliales, su localización y en el epitelio superficial o de las criptas intestinales, y su organización formando nidos o placas. Para el estudio de los linfocitos intraepiteliales se han evaluado las muestras con el marcador CD3, mediante técnicas inmunohistoquímicas. Los linfocitos intraepiteliales son todos de tipo T y, por tanto, positivos a esta proteína, lo que facilita su detección y evaluación. Dado que se ha utilizado la inmunohistoquímica para la valoración de los linfocitos intraepiteliales, se van a comentar más adelante.

5.4.2.1 PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL INFILTRADO DE CÉLULAS REDONDAS

Lo más frecuente en los tres grupos de estudio es la presencia de un **infiltrado de células redondas de carácter difuso, de densidad alta**. Además, en tres animales del grupo IBD y en el uno del grupo DLP, el infiltrado parece una expansión de folículos linfoides. En el grupo Linfoma, el 37,5% de los casos (n = 3) presentan un infiltrado neoplásico predominantemente focal o multifocal, lo que no descarta un infiltrado inflamatorio concomitante de carácter difuso. Esto ocurre también en uno de los casos del grupo DLP.

En cuanto a la **localización del infiltrado**, observamos unos resultados muy variables. Lo más frecuente en el grupo Linfoma es una obliteración de la lámina propia (62,5% de los casos), apareciendo en el resto de los casos una obliteración de la lámina propia de las vellosidades intestinales, combinada en uno de los casos con un infiltrado en forma de banda. En los casos del grupo IBD este parámetro no lo consideramos valorable dentro de estas categorías. Ya se ha comentado que se trata de un infiltrado difuso de densidad alta, pero sin llegar a obliterar la lámina propia en la mayoría de los casos. Sólo en cuatro de los casos del grupo IBD se ha considerado que el infiltrado llega a obliterar la lámina propia, y en uno de los casos que el infiltrado se produce de manera más intensa en forma de parches, pese a ser predominantemente difuso. En el grupo DLP, pese a considerarse, como ya se ha comentado, un infiltrado difuso, existen concentraciones multifocales de linfocitos sugerentes de linfoma en

forma de parches en la lámina propia en el 55,5% de los casos. En tres de los casos de este grupo (33,3%) se ha considerado que existe obliteración de la lámina propia, y en uno más (11,1%), que se trata de una obliteración de la lámina propia de las vellosidades.

5.4.3. PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL LINFOMA INTESTINAL

La **estructura de la pared intestinal** está conservada en todos los animales del grupo IBD, así como del grupo DLP. Tan sólo en uno del grupo IBD hay una pérdida ligera de la estructura de la pared. Sin embargo, en el 62,5% ($n = 5$) de los casos del grupo Linfoma existe una pérdida, en mayor o menor medida, de la estructura de la pared intestinal, que es estadísticamente significativa respecto a los otros dos grupos ($p < 0,001$). Este parámetro se ha asociado significativamente con un mayor índice de gravedad de la lesión inflamatoria duodenal a nivel histopatológico ($p < 0,001$).

Existe una asociación significativa entre el engrosamiento de la pared intestinal a nivel ecográfico y la pérdida de estructura de la pared intestinal a nivel histológico ($p = 0,015$). La pérdida de diferenciación de capas también se ha asociado significativamente con una pérdida de estructura de la pared intestinal a nivel histológico ($p < 0,001$).

En cuanto a la posible relación de este parámetro con los parámetros endoscópicos, se encontrado una asociación entre la conservación de la estructura de la pared intestinal a nivel histológico y la presencia de una mucosa friable a la toma de biopsias endoscópicas, de manera que en ninguno de los cinco casos en los que existe una pérdida de estructura de la pared intestinal, existe una mucosa friable a la toma de biopsias ($p = 0,010$). La presencia de una mucosa dura a la toma de biopsias se ha relacionado, por el contrario, con la pérdida de estructura de la pared intestinal a nivel histológico ($p = 0,003$).

En cuanto al **infiltrado de células redondas**, éste es siempre **polimórfico** en los casos diagnosticados de IBD, mientras que es **monomórfico** en todos los casos de linfoma intestinal. Destacamos que, en el grupo DLP, existen casos en los que, pese a que el infiltrado es predominante polimórfico, aparecen zonas de un carácter monomórfico, que son precisamente las áreas sospechosas, que indican realizar un diagnóstico diferencial con un proceso neoplásico incipiente. Esto ocurre en el 77,8% de los casos del grupo DLP.

El carácter monomórfico del infiltrado linfocitario se ha asociado significativamente con el engrosamiento de la pared intestinal ($p = 0,004$) y con una pérdida de diferenciación de capas ($p < 0,001$), a nivel ecográfico. En cuanto a los parámetros endoscópicos, el infiltrado monoformo ha resultado significativamente más frecuente en los casos en que existe una mucosa de consistencia dura a la toma de biopsias ($p = 0,019$). Además, este tipo de infiltrado se ha asociado significativamente al grado intenso de algunos parámetros histopatológicos como el acortamiento-ensanchamiento de vellosidades ($p = 0,030$) y la lesión epitelial ($p = 0,036$).

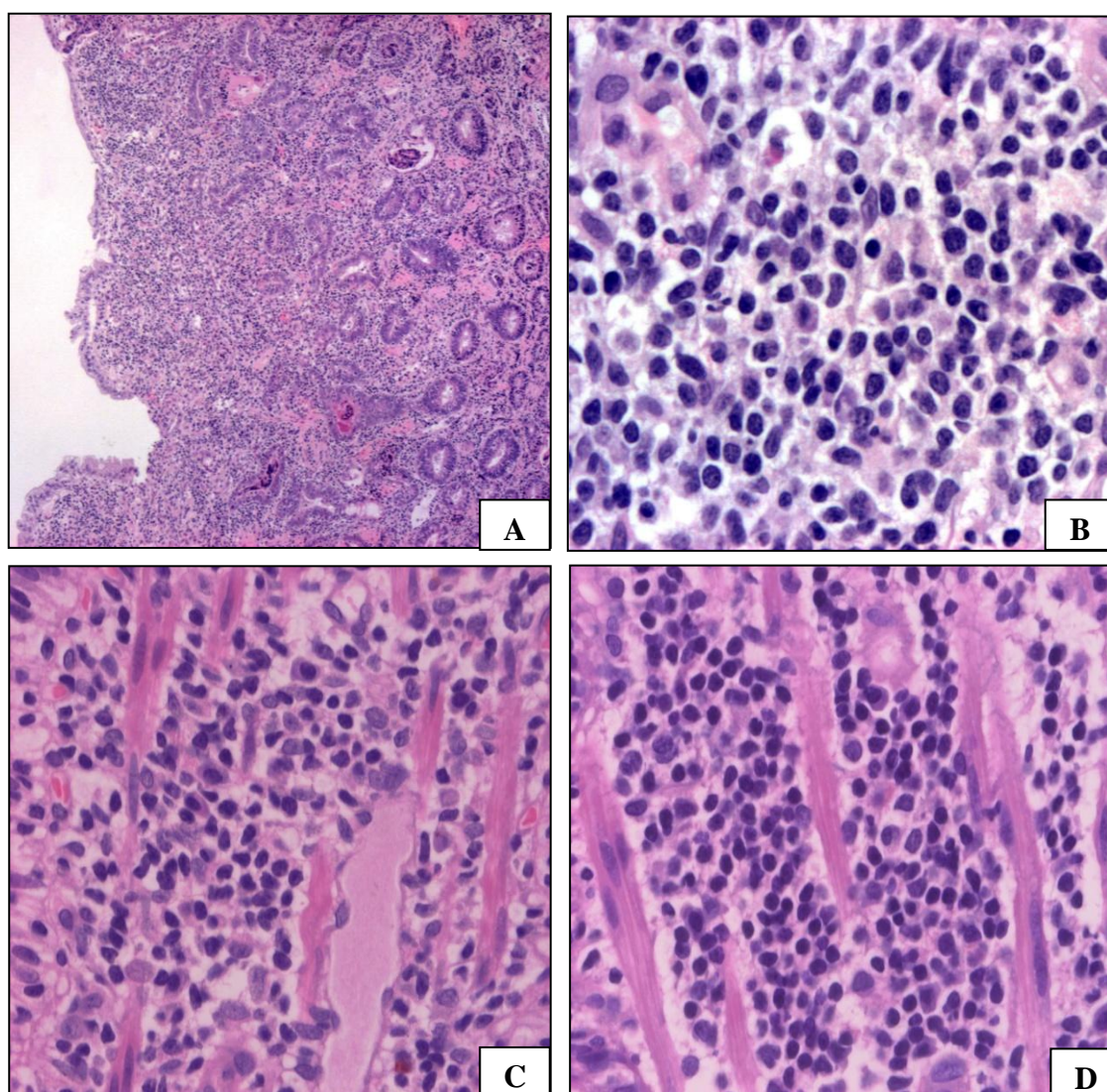


Figura 17. **A.** Caso 4, grupo Linfoma. Pérdida de estructura de la pared intestinal. H-E, 4x. **B.** Caso 4, grupo Linfoma, infiltrado monomórfico, H-E, 40x. **C.** Caso 13, grupo IBD. Infiltrado polimórfico. H-E, 40x. **D.** Caso 3, grupo IBD, detalle de un infiltrado sugerente de linfoma con la tinción de H-E, 40x.

5.4.3.1. MORFOLOGÍA E ÍNDICE MITÓTICO DE LOS LINFOMAS INTESTINALES

En cuanto al tamaño celular de los ocho casos incluidos en el grupo Linfoma, seis de ellos se han clasificado como linfomas de células grandes, lo que constituye el 75% de los casos. El 25% restante se han clasificado como linfomas de células pequeñas (figura 18).

Los linfomas de células pequeñas se caracterizan por linfocitos de núcleo picnótico, ausencia de nucleolos evidentes, cromatina muy condensada y casi ausencia de citoplasma. Sin embargo, entre los linfomas de células grandes, tres de los casos presentan ausencia de nucleolos evidentes y cromatina pulverulenta, y citoplasma claro. Los otros tres casos de células grandes presentan una predominancia de células con nucleolos evidentes y múltiples (en algunos casos únicos), citoplasma casi inexistente, cromatina difusa y de aspecto granular. En todos los casos hay también linfocitos pequeños y picnóticos, que se han considerado linfocitos no neoplásicos, correspondientes al proceso inflamatorio asociado, presente en todas las muestras. Se ha observado pleomorfismo celular en el 62,5% de los linfomas ($n = 5$), todos ellos de células grandes. En la mayoría de las muestras se han observado vellosidades de aspecto normal junto a otras de aspecto neoplásico.

Se ha encontrado una relación significativa entre el tamaño celular y el índice de alteración endoscópica, de manera que este índice es mayor en los linfomas de células grandes que en los de células pequeñas, como puede observarse en la tabla 22.

	n	Media Índice Endoscopia	Desviación Típica	P
Linfomas de células grandes	6	6,33	0,82	0,009
Linfomas de células pequeñas	2	4,00	0,00	

Tabla 22. Diferencias significativas en el índice de alteración endoscópica según el tamaño celular de los casos de linfoma.

El índice mitótico ha variado entre 6 y 24. Para los linfomas de células grandes la media de índice mitótico ha sido de 13,8, con tan solo un caso con un índice mitótico bajo, de 6; mientras que para los de células pequeñas ha sido más bajo, con una media de de 7,5. El índice mitótico observado al microscopio

óptico ha presentado una correlación significativa y alta con el índice de alteración endoscópica ($r = 0,799$; $p = 0,017$) y con el índice de gravedad de la lesión inflamatoria duodenal a nivel histopatológico ($r = 0,722$; $p = 0,043$).

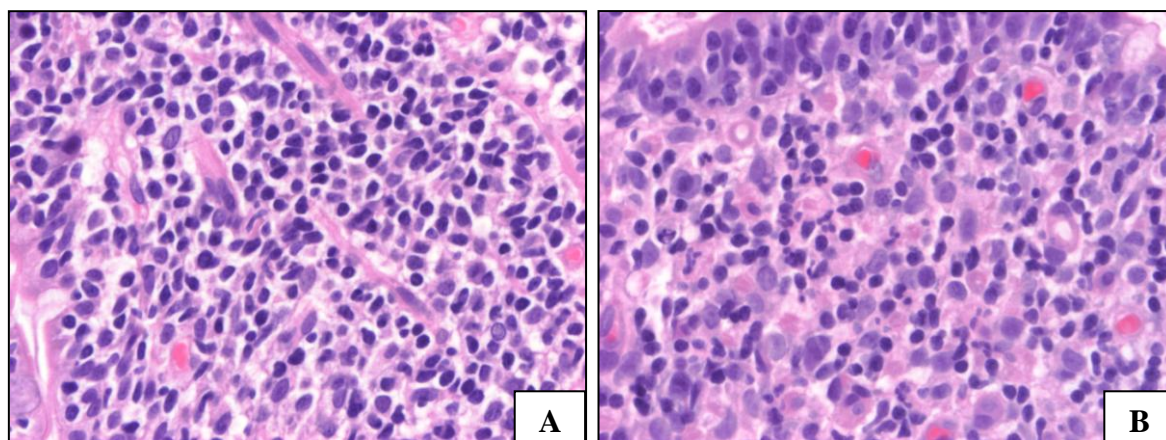


Figura 18. **A.** Caso 23, grupo Linfoma. Linfoma de células pequeñas, H-E, 40x. **B.** Caso 31, grupo Linfoma. Linfoma de células grandes, H-E, 40x.

5.5 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Los resultados del estudio inmunohistoquímico de los marcadores linfocitarios CD3 y CD20, y del índice de proliferación celular Ki-67 se detallan en este apartado. Los marcadores CD3 y CD20 se han utilizado como complemento al diagnóstico de las lesiones para categorizarlas en los tres grupos de estudio: grupo IBD, grupo Linfoma y grupo DLP, así como para establecer el inmunofenotipo de cada muestra. Además, CD3 se ha utilizado para el estudio de los linfocitos intraepiteliales.

5.5.1. EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES LINFOCITARIOS CD3 Y CD20

5.5.1.1. CLASIFICACIÓN DE LAS LESIONES UTILIZANDO CD3 Y CD20

Una vez establecidas, mediante el estudio histológico, unas categorías iniciales, se analizaron los resultados inmunohistoquímicos obtenidos para los marcadores CD3 y CD20. Esto ha permitido establecer una nueva clasificación que es la que se ha utilizado a lo largo del trabajo. En la tabla 23 se muestra la clasificación, antes y después de realizar las técnicas inmunohistoquímicas.

Como podemos observar en la tabla 23, tras estudiar las muestras con técnicas inmunohistoquímicas para los marcadores linfocitarios CD3 y CD20, fue posible concretar el diagnóstico de seis de los casos que originariamente consideramos desorden linfoproliferativo no caracterizado, pasando cinco de ellos al grupo IBD, y uno de ellos al grupo Linfoma. Sin embargo, dos de nuestros casos diagnosticados inicialmente de IBD pasan al grupo DLP tras la observación de las muestras teñidas con CD3 y CD20. Todos los casos diagnosticados con H-E de linfoma siguen en este grupo tras la observación de las muestras teñidas con los marcadores linfocitarios.

Caso	GRUPOS H-E	GRUPOS H-E + CD3 y CD20	
1	DLP	IBD	Grupo IBD
3	DLP	IBD	
10	IBD	IBD	
11	DLP	IBD	
12	IBD	IBD	
13	IBD	IBD	
14	DLP	IBD	
15	IBD	IBD	
17	IBD	IBD	
18	IBD	IBD	
19	IBD	IBD	
20	IBD	IBD	
27	DLP	IBD	
29	IBD	IBD	
32	IBD	IBD	
4	Linfoma	Linfoma	Grupo Linfoma
5	DLP	Linfoma	
6	Linfoma	Linfoma	
7	Linfoma	Linfoma	
8	Linfoma	Linfoma	
9	Linfoma	Linfoma	
23	Linfoma	Linfoma	
31	Linfoma	Linfoma	
2	DLP	DLP	Grupo DLP
16	DLP	DLP	
21	DLP	DLP	
22	DLP	DLP	
24	IBD	DLP	
25	DLP	DLP	
26	DLP	DLP	
28	DLP	DLP	
30	IBD	DLP	

Tabla 23. Establecimiento de los grupos de diagnóstico con H-E y después de realizar las técnicas inmunohistoquímicas para CD3 y CD20.

La inclusión de los animales en el grupo DLP se basó en la presencia de zonas con agregados focales o multifocales (en ocasiones de una sola vellosidad) de una población linfocitaria más o menos monomórfica y de densidad alta. Otras veces se observaron grupos de linfocitos que podrían corresponder a un folículo linfoide pero, debido al corte y la orientación de las biopsias endoscópicas, no se ha podido precisar su origen. Otra característica que nos ha

hecho sospechar de algunos de los casos, y no tener claro su diagnóstico como IBD, es la presencia masiva de linfocitos intraepiteliales, formando placas en el epitelio de revestimiento.

Los casos que han pasado del grupo IBD al grupo DLP tras analizar las preparaciones teñidas con CD3 y CD20 han sido, o bien por la presencia masiva de linfocitos intraepiteliales, evidenciados con CD3, o bien por la presencia de grupos de linfocitos CD3 positivos en la lámina propia de la o las vellosidades intestinales, escasamente positivos a CD20. Por otro lado, en los casos que han pasado de DLP a IBD, se ha evidenciado una expresión mixta de CD20 y CD3 en las zonas que se habían considerado sospechosas, o bien se ha confirmado que se trataba de una placa de Peyer. El único caso que ha pasado de DLP a linfoma presentaba acúmulos de linfocitos de carácter predominantemente monomórfico en el ápice de algunas vellosidades, que han resultado fuertemente positivas a CD3, y negativas a CD20, además de presentar linfocitos intraepiteliales en forma de placas.

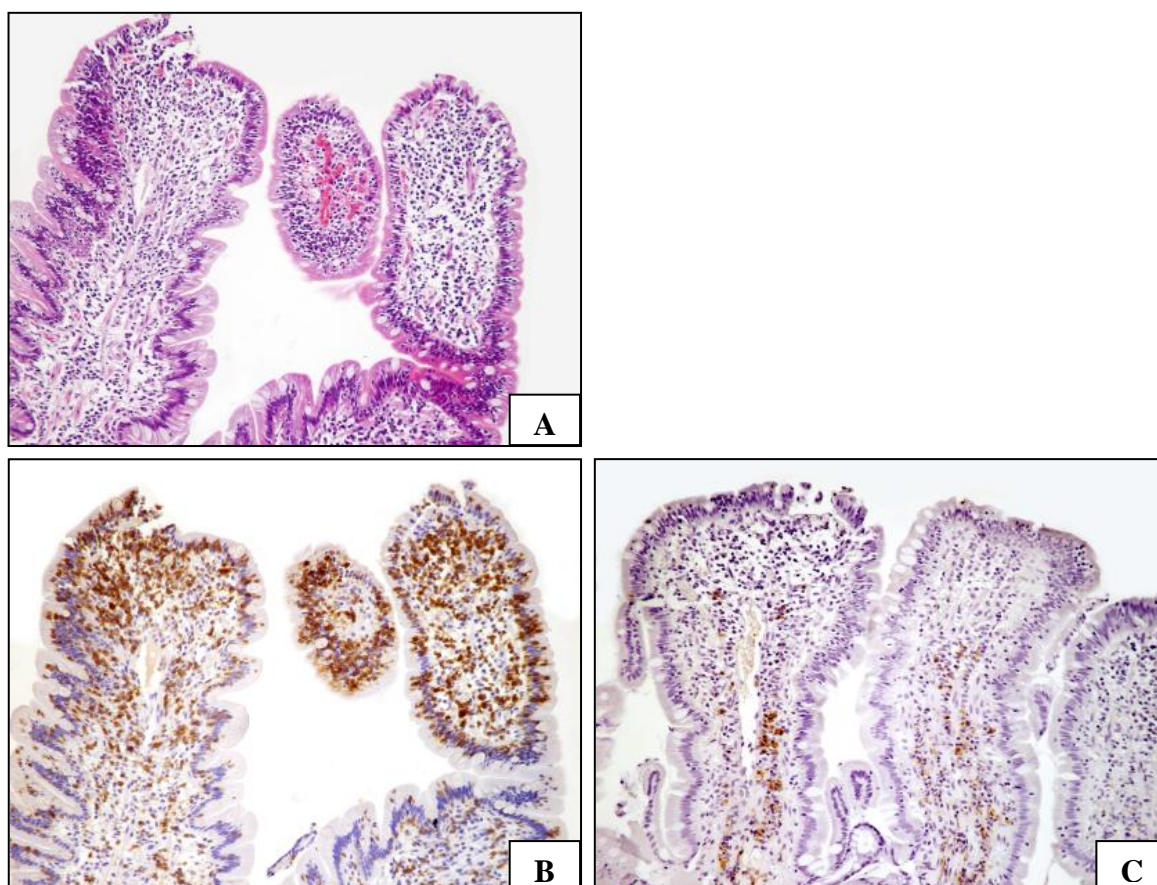


Figura 19. Caso 24, grupo DLP. Caso que fue diagnosticado de IBD al estudiarlo con H-E, 10x (A), y que ha pasado al grupo DLP tras estudiar las muestras con técnicas inmunohistoquímicas para CD3, 10x (B) y CD20, 10x (C).

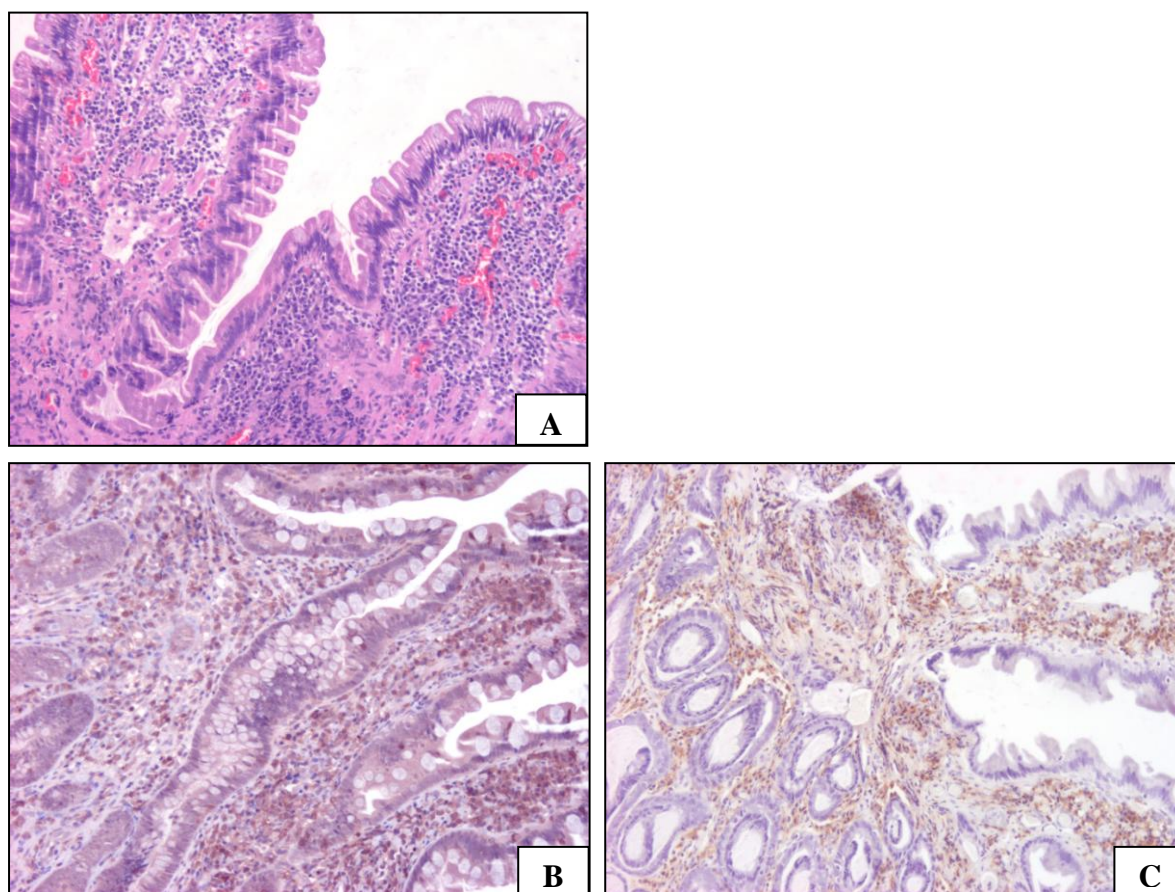


Figura 20. Caso 3, grupo IBD. Caso que fue diagnosticado de DLP al estudiarlo con H-E, imagen a 10x **(A)**, y que ha pasado al grupo IBD tras estudiar las muestras con técnicas inmunohistoquímicas para CD3, imagen a 10x **(B)** y CD20, imagen a10x **(C)**.

5.5.1.2. INMUNOFENOTIPO DE LAS LESIONES

El estudio de la expresión de los marcadores linfocitarios CD3 y CD20 nos ha permitido establecer el inmunofenotipo del grupo de linfomas. Todos los linfomas han resultado ser de inmunofenotipo T, con una expresión mayoritaria del anticuerpo CD3, y muy escasa o casi inexistente de CD20 (figura 19). En este caso nos referimos a las zonas de las biopsias endoscópicas en las que se evidenciaba el linfoma intestinal. Como se ha comentado en apartados previos, todas las muestras presentaban un infiltrado inflamatorio asociado, de linfocitos y células plasmáticas, muchas veces en zonas adyacentes a la lesión tumoral, con células positivas tanto a CD3 como a CD20. La inmunoexpresión de CD20 se observaba, fundamentalmente, en zonas profundas de la lámina propia.

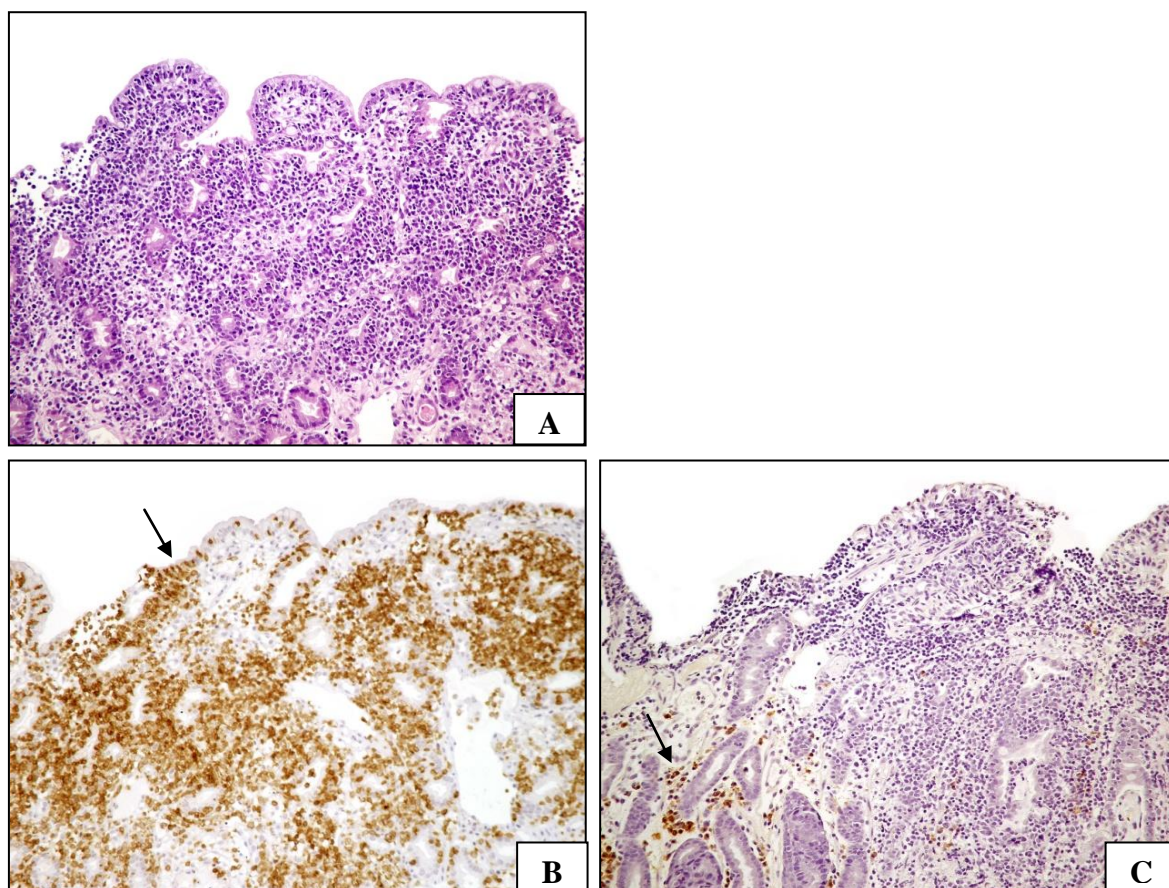


Figura 20. Caso 7, grupo Linfoma. Linfoma T teñido con H-E, 20x **(A)**. La imagen **B** corresponde a la misma muestra, masivamente teñida con CD3. Obsérvese el detalle de los linfocitos intraepiteliales positivos a CD3 (flecha). La **C** es también el mismo caso, con escasa positividad a CD20, que corresponde a un infiltrado inflamatorio asociado (flecha).

Todos los animales del grupo IBD presentaron un inmunofenotipo mixto, con expresión de ambas proteínas, CD3 y CD20. En el grupo DLP, el 44,4% (n =4) de los casos presentaron un inmunofenotipo mixto, mientras que en el 55,6% (n = 5) restante se consideró que la zona sospechosa era de inmunofenotipo T, incluso simplemente por la presencia masiva de linfocitos intraepiteliales de tipo T, que podían constituir linfocitos neoplásicos o preneoplásicos

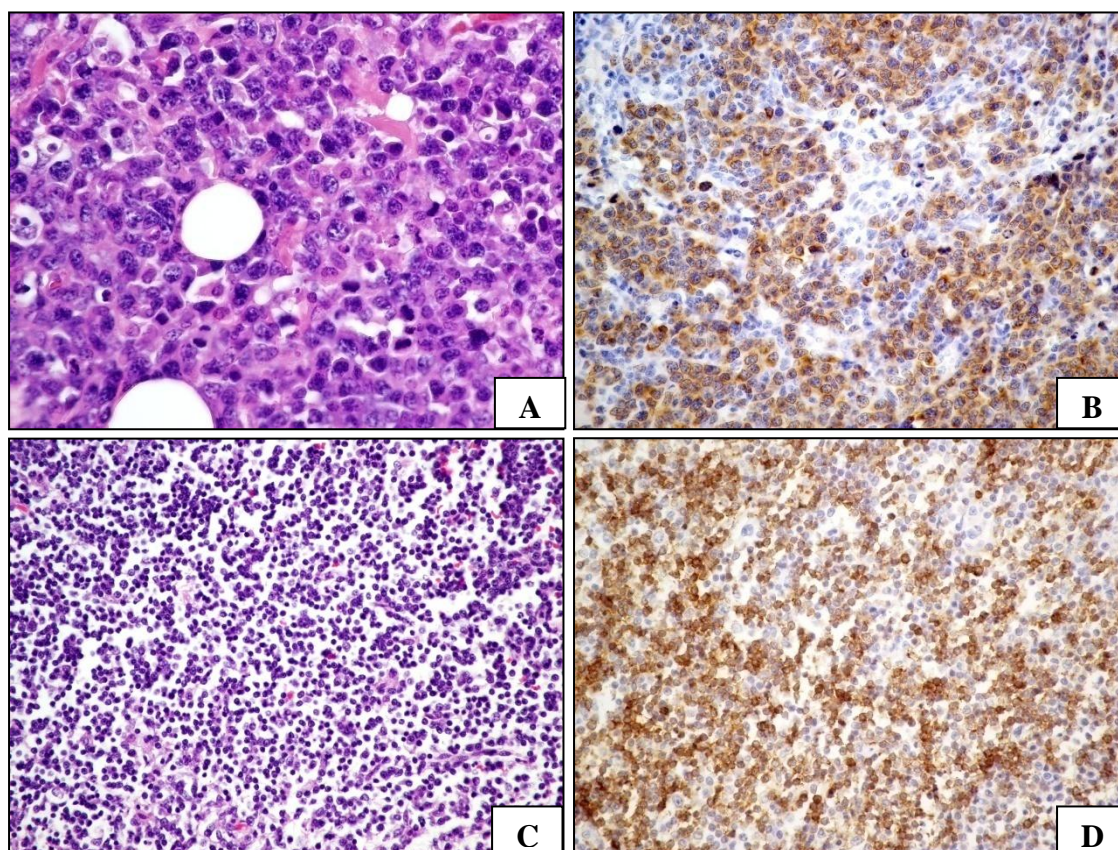


Figura 21. Caso 23, Linfoma T de células grandes, teñido con H-E **(A)** y con inmunohistoquímica para CD3 **(B)**. Caso 8, Linfoma T de células pequeñas, teñido con H-E **(C)** y con inmunohistoquímica para CD3 **(D)**.

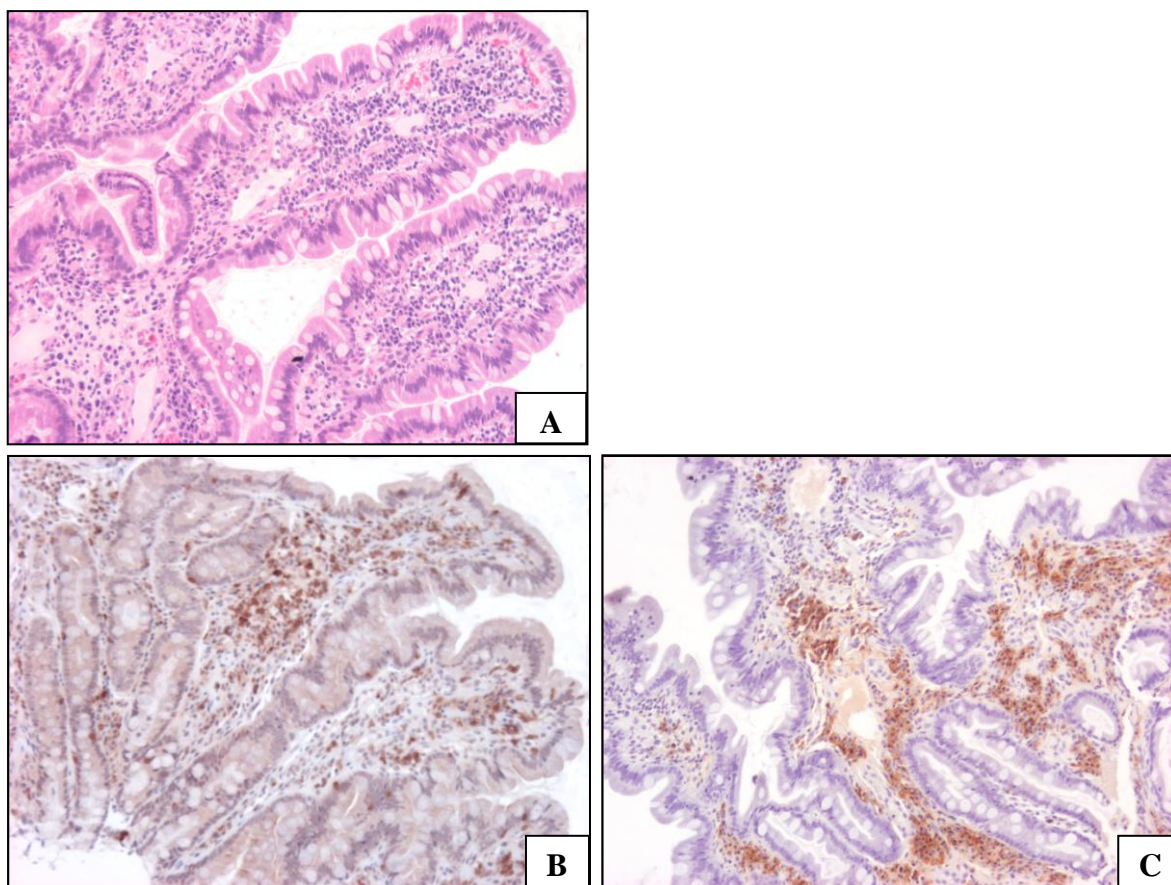


Figura 22. Caso 2, grupo IBD. Observamos el mismo caso teñido con H-E, imagen a 10x **(A)**, con inmunohistoquímica para CD 3, imagen a 10x **(B)**, y con inmunohistoquímica para CD 20, 10x **(C)**. Obsérvese el inmunofenotipo mixto característico del IBD.

5.5.1.3 ESTUDIO DE LOS LINFOCITOS INTRAEPITELIALES TEÑIDOS CON CD3

En todos los casos los linfocitos intraepiteliales presentaron un inmunofenotipo T, tiñéndose con el marcador CD3. La realización de técnicas inmunohistoquímicas nos permitió estudiar más a fondo los linfocitos intraepiteliales, su localización en el epitelio superficial o el de las criptas, la afectación focal o multifocal, en una o varias vellosidades, o bien de forma difusa a lo largo de la preparación, así como su organización en forma de células aisladas, nidos o placas. Los resultados de los parámetros relacionados con los linfocitos intraepiteliales (LIE) valorados con CD3 se muestran en la tabla 24, y se comentan a continuación.

	Caso	Localización LIE	Organización LIE	Afectación LIE
Grupo IBD	1	1	3	1
	3	0	0	0
	10	0	0	0
	11	1	2	1
	12	0	0	0
	13	0	0	0
	14	1	2	1
	15	0	0	0
	17	1	1	1
	18	1	1	1
	19	1	2	1
	20	0	0	0
	27	0	0	0
	29	1+2	1	1
	32	1+2	1	1
Grupo Linfoma	4	1	2	1
	5	1+2	2	1
	6	1	1	2
	7	1+2	3	1
	8	1+2	3	1
	9	1+2	3	1
	23	1	3	2
	31	1+2	3	1
Grupo DLP	2	1	1	1
	16	1	3	1
	21	1	3	2
	22	1	1	1
	24	1	3	2
	25	0	0	0
	26	1	3	2
	28	1	3	1
	30	1	3	2

Tabla 24. Parámetros relacionados con los LIE valorados con CD3 en los tres grupos de estudio. Localización LIE: 0 = ausencia de LIE, 1 = LIE en el epitelio superficial, 2 = LIE en el epitelio de las criptas. Organización LIE: 0 = ausencia de LIE, 1 = LIE en forma de células aisladas, 2 = LIE formando nidos, 3 = LIE formando placas. Afectación LIE: 0 = ausencia de LIE, 1= LIE de forma difusa a lo largo de la muestra, 2 = LIE localizados en una o varias vellosidades.

Los linfocitos intraepiteliales (LIE), valorados con CD3, están presentes en todos los animales del grupo Linfoma, en el 53,3% de los casos del grupo IBD, y en el 88,9% de los casos del grupo DLP. La **localización** más frecuente es que

estos LIE se limiten al epitelio de revestimiento en los grupos IBD y DLP, apareciendo además en el epitelio de las criptas, en 13,3% de perros del grupo IBD, y en el 62,5% de los casos del grupo Linfoma, y en ninguno del grupo DLP. Las diferencias entre grupos son significativas para este parámetro, encontrándose el porcentaje de casos que tienen infiltrado de linfocitos intraepiteliales tanto en el epitelio superficial como en el epitelio de las criptas por encima del valor esperado en el grupo Linfoma, y el porcentaje de casos con ausencia de linfocitos intraepiteliales por encima del esperado en el grupo IBD ($p = 0,002$).

La intensidad del infiltrado de linfocitos intraepiteliales (**organización** en tabla 24) es notablemente más alta en los casos del grupo Linfoma, apareciendo en forma de placas en el 62,5% de los casos, en forma de nidos en el 25%, y de células aisladas en tan solo un caso. En el caso del grupo IBD, sin embargo, lo más frecuente es que aparezcan en forma de células aisladas (26,7%), o de nidos (20%), siendo poco frecuente su organización en placas (6,7%). Encontramos que el porcentaje de casos dentro del grupo IBD que presentan placas (6,7%) es significativamente inferior al esperado ($p = 0,019$). En el grupo DLP destaca la presencia mayoritaria de linfocitos intraepiteliales en forma de placas, presentes en el 66,7% de los casos, apareciendo en forma de células aisladas en el resto (22,2%).

En cuanto a la **afectación** (tabla 24), la infiltración de linfocitos intraepiteliales se considera difusa a lo largo de la preparación en la mayoría de los casos de los tres grupos. Tan sólo afecta a una sola vellosidad o a un grupo de ellas en el 25% de los casos del grupo Linfoma, y en el 44,4% de los casos del grupo DLP. Todos los casos del grupo IBD presentan una afectación difusa.

Como se observa en la tabla 24, el 87,5% de los casos del grupo Linfoma presentan linfocitos intraepiteliales formando nidos o placas, por lo que se trata de linfomas T epiteliotrópicos (French y col., 1996; Krecic y col., 2000; Carreras y col., 2003). Sin embargo, basándonos en las características descritas previamente, según la clasificación de la OMS para los linfomas en medicina humana (Swerdlow y col., 2008), los linfomas T de células grandes de este estudio corresponden con el linfoma T asociado a enteropatía (EATL) de tipo I (75%), mientras que los de células pequeñas corresponden con el EATL de tipo II (25%).

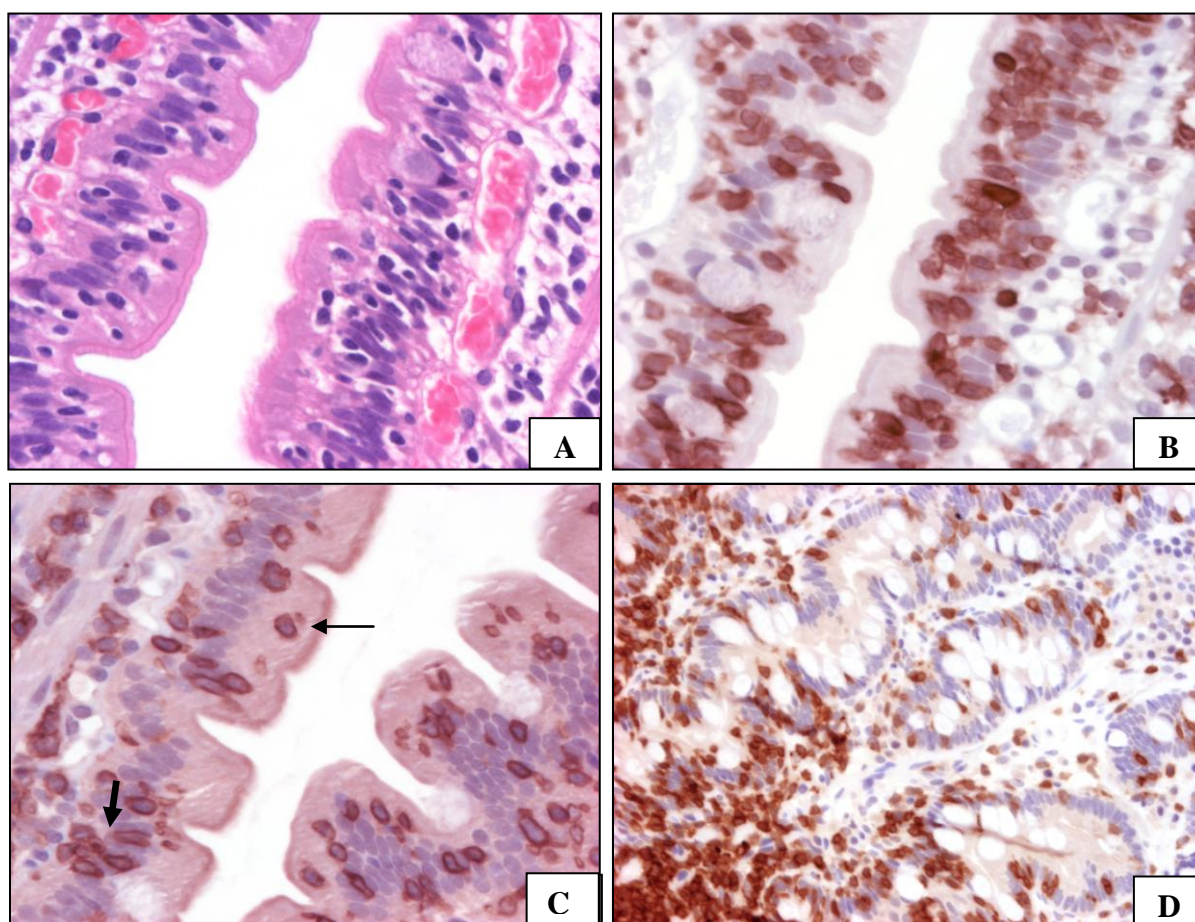


Figura 23. Caso 30, grupo DLP. Linfocitos intraepiteliales formando placas en el epitelio de reverstimiento, teñidos con H-E, 40x **(A)**, y evidenciados con CD3, 40x **(B)**. Caso 25, grupo DLP. Linfocitos intraepiteliales en forma de células aisladas (flecha fina), y formando nidos (flecha gruesa) en el epitelio de revestimiento, inmunohistoquímica para CD3, 40x **(C)**. Caso 31, grupo Linfoma, linfocitos intraepiteliales en el epitelio de las criptas, inmunohistoquímica para CD3, 20x **(D)**.

5.5.2. EXPRESIÓN DEL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR Ki-67

Se ha establecido un índice de proliferación celular para cada muestra y se ha calculado la media para cada uno de los grupos. Los resultados se reflejan en la tabla 25, donde se muestran las medias, desviaciones típicas y valores mínimos y máximos del índice de Ki-67 para cada grupo de estudio.

	n	Ki-67 Media (%)	Desviación Típica	Valor máximo (%)	Valor mínimo (%)	p
Grupo IBD	15	11,23	6,46	24,14	3,45	< 0,001
Grupo Linfoma	8	52,87	11,88	63,98	30,75	
Grupo DLP	9	22,06	11,51	47,15	9,3	

Tabla 25. Índice de proliferación celular Ki-67 para los tres grupos de estudio.

Como se observa en la tabla 25, los valores de Ki-67 para el grupo Linfoma son significativamente superiores que para el grupo IBD, e incluso que para el grupo DLP, siendo las diferencias entre los tres grupos estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

En el grupo Linfoma todos los casos presentan una expresión entre el 30 y el 64% (gráfico 8). Sin embargo, en el grupo IBD sólo uno de los casos presenta una expresión por encima del 20% (6,6% de los casos del grupo), y tres de ellos por encima del 15% (20% de los casos del grupo). En el grupo DLP, sólo dos de los casos (22,2%) presentan una expresión mayor del 25%, como podemos observar en el gráfico 8.

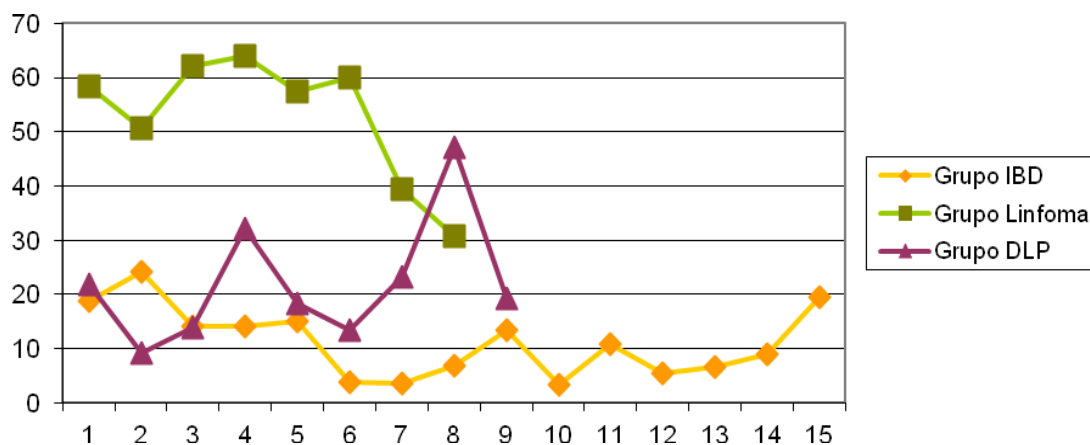


Gráfico 8. Valores del índice Ki-67 para cada caso según el grupo de estudio.

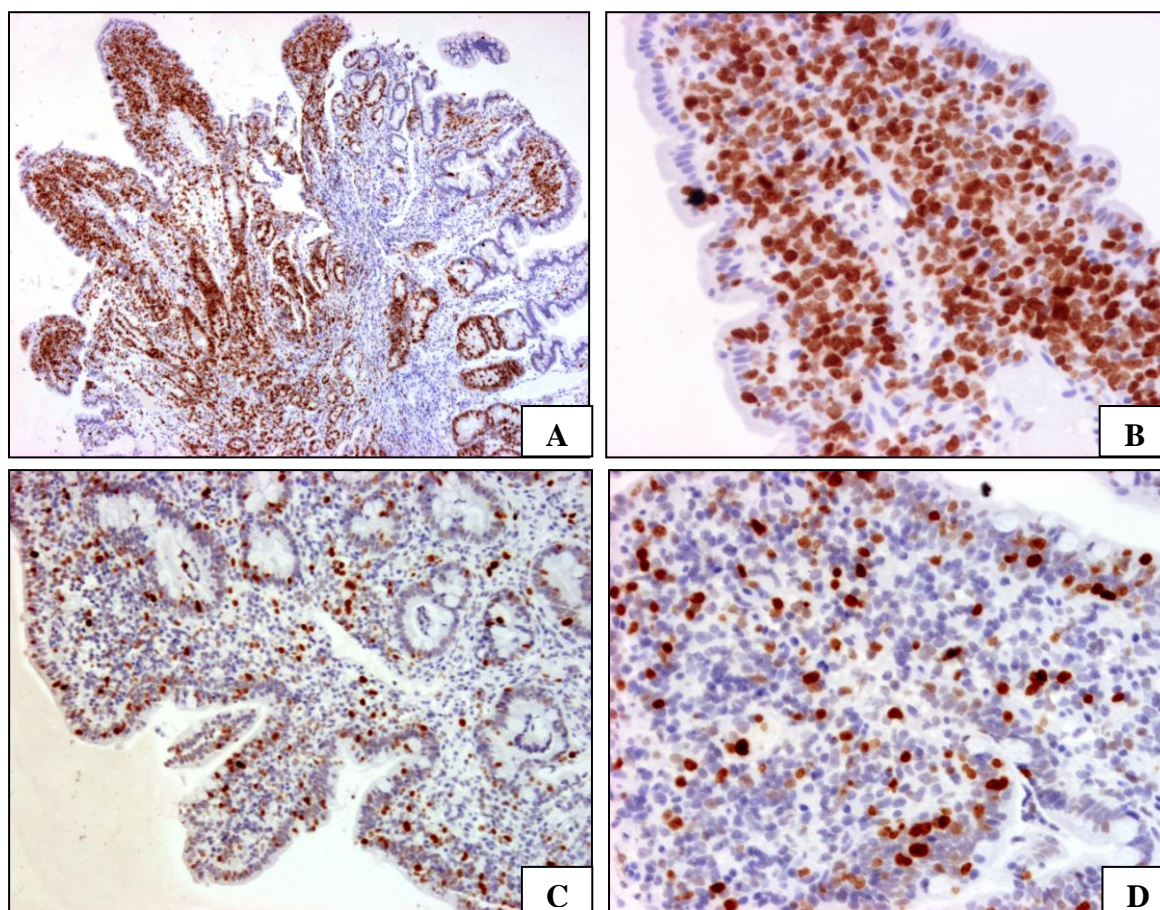


Figura 24. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en dos de los casos del grupo Linfoma. Caso 9, 60,07% de inmunoexpresión de Ki-67, 4x (A), y 20x (B). Caso 31, 30,76% de inmunoexpresión de Ki-67, 10x (C), y 40x (D).

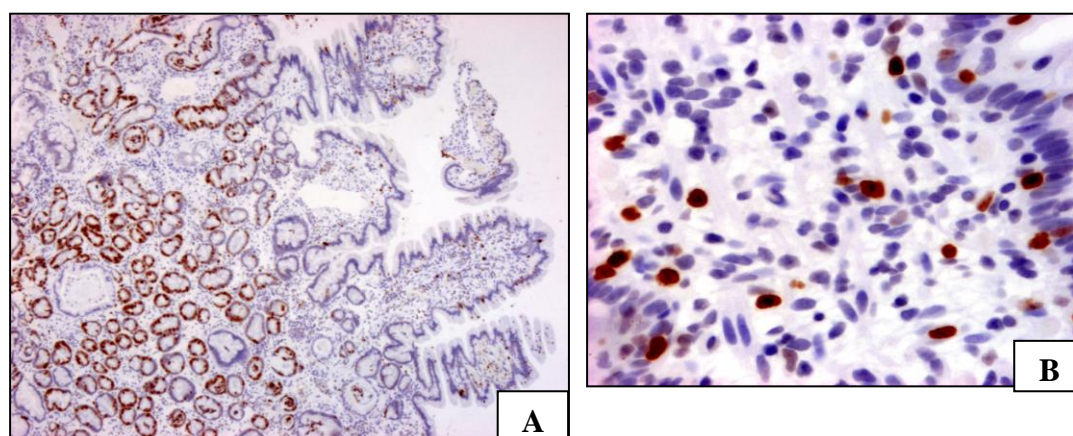


Figura 25. Expresión de Ki-67 en el caso 19 del grupo IBD. Este caso presentó un 10,75% de expresión de Ki-67. La imagen A está sacada a 4x, La imagen B representa el detalle de una vellosidad a 40x.

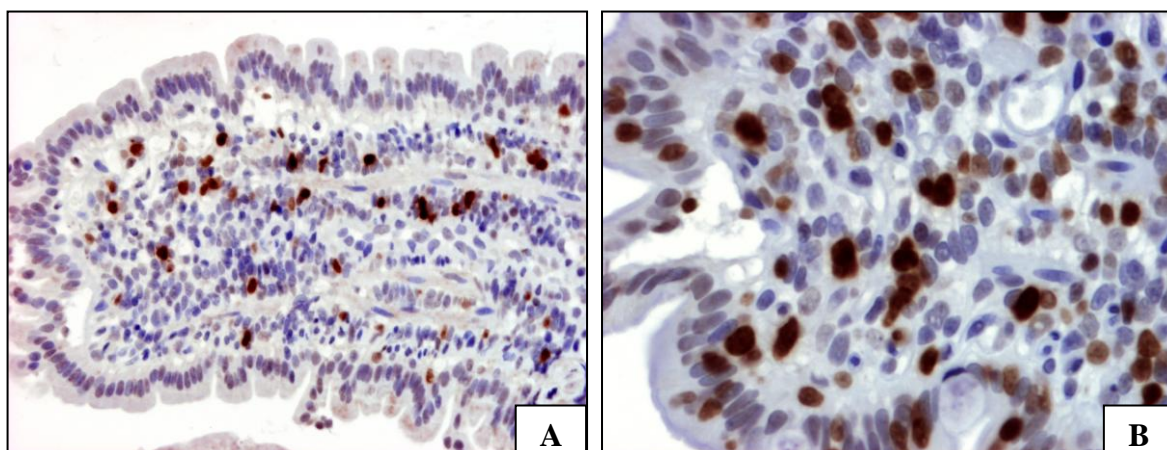


Figura 26. Expresión de Ki-67 en dos casos del grupo DLP. **A.** Caso 25, 13,53% de expresión de Ki-67 (20x). **B.** Caso 28, 47,15% de expresión de Ki-67, detalle de una vellosidad (40x).

5.5.2.1 RELACIÓN DE KI-67 CON LOS PARÁMETROS CLÍNICOS Y ENDOSCÓPICOS

El índice de proliferación celular Ki-67 se ha relacionado con algunos de los **parámetros clínicos**. Existen diferencias significativas en la expresión de Ki-67 entre los perros que no presentan alteraciones del apetito y los que presentan alteraciones de grado moderado o grave, de manera que la expresión de Ki-67 es más elevada en estos últimos ($p = 0,003$).

En cuanto a la **ecografía**, se han encontrado diferencias significativas en el índice de proliferación celular Ki-67 para los parámetros ecográficos que se detallan en la tabla 26, de manera que este índice es mayor en los animales que presentan engrosamiento de la pared de intestino delgado, en los que existe una pérdida de diferenciación de capas, y en los que presentan linfadenopatías mesentéricas.

	n	Ki-67 Media (%)	Desviación Típica	p
Engrosamiento pared ID				
Presencia	15	34,93	22,71	0,003
Ausencia	17	15,65	9,94	
Pérdida diferenciación de capas				
Presencia	6	49,88	21,71	< 0,001
Ausencia	26	18,87	13,74	
Linfadenopatías mesentéricas				
Presencia	5	41,70	20,68	0,031
Ausencia	27	21,54	17,91	

Tabla 26. Relaciones estadísticamente significativas entre el índice de proliferación celular Ki-67 y los parámetros ecográficos.

Existen, también, diferencias significativas en la expresión de Ki-67 en algunos **parámetros endoscópicos**. Así, la expresión inmunohistoquímica del índice de proliferación celular ha resultado significativamente mayor en los casos que presentaron soluciones de continuidad de grado grave en comparación con los de grado leve y aquellos con ausencia de soluciones de continuidad. Ha sido también más elevada en los casos con mucosa de consistencia dura a la toma de biopsias que en los que no la presentaron (tablas 27 y 28).

	n	Ki-67 Media (%)	Desviación Típica	p
Soluciones de continuidad				
Ausencia	16	19,46	14,43	0,014
Leve	11	22,11	19,89	
Grave	5	47,09	20,41	
Mucosa dura a la toma de biopsias				
Presencia	5	45,71	18,04	0,006
Ausencia	27	20,79	17,37	

Tabla 27. Relaciones estadísticamente significativas entre el índice de proliferación celular Ki-67 y los parámetros endoscópicos.

Bonferroni

Variable dependiente	(I) SOLUCIONES CONTINUIDAD	(J) SOLUCIONES CONTINUIDAD	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	p	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Ki-67	ausencia	presencia	-2,6479	6,8023	1	-19,932	14,636
		mucha presencia	-27,6286*	8,8981	0,013	-50,238	-5,019
		presencia					
	presencia	ausencia	2,6479	6,8023	1	-14,636	19,932
		mucha presencia	-24,9807*	9,3672	0,037	-48,782	-1,179
		presencia					
	mucha	ausencia	27,6286*	8,8981	0,013	5,019	50,238
	presencia	presencia	24,9807*	9,3672	0,037	1,179	48,782

Tabla 28. Test de Bonferroni, para comprobar entre qué categorías son significativas las diferencias en la expresión de Ki-67 para el parámetro endoscópico de soluciones de continuidad. *. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

5.5.2.2 RELACIÓN DE KI-67 CON LOS PARÁMETROS HISTOPATOLÓGICOS

En cuanto a los **parámetros de la WSAVA** para la valoración de la inflamación intestinal, se han encontrado diferencias significativas en la expresión inmunohistoquímica del índice de proliferación celular Ki-67 según el acortamiento-ensanchamiento de vellosidades (W1, entre los grados leve y moderado, y moderado y grave) y la lesión epitelial (W2, entre los grados normal y moderado, normal y grave, y leve y grave), que se muestran en la tabla 29.

	N	Ki-67 Media (%)	Desviación Típica	p
W1				
Leve	17	17,73	14,43	< 0,001
Moderado	11	26,91	18,12	
Grave	3	61,20	3,34	
W2				
Normal	15	14,69	12,24	< 0,001
Leve	9	22,65	13,87	
Moderado	6	39,94	21,23	
Grave	2	63,05	1,31	

Tabla 29. Parámetros con diferencias significativas en la expresión inmunohistoquímica del índice de proliferación celular Ki-67.

En cuanto a la relación de los linfocitos intraepiteliales con la expresión del índice de proliferación celular Ki-67, hemos encontrado una expresión significativamente superior en los casos que presentaban linfocitos intraepiteliales con respecto a los que no los presentaban, tal y como queda reflejado en la tabla 30:

LIE	n	Ki-67 Media (%)	Desviación Típica	p
Ausencia	8	11,19	6,85	0,001
Presencia	24	29,19	20,32	

Tabla 30. Expresión de Ki-67 en los casos con y sin presencia de linfocitos intraepiteliales.

Además, existen diferencias en la expresión de Ki-67 entre las muestras que no presentan linfocitos intraepiteliales, las que presentan linfocitos intraepiteliales únicamente en el epitelio superficial, y las que los presentan tanto en el epitelio superficial como en el epitelio de las criptas, de manera que las diferencias son estadísticamente significativas entre los que no presentan

linfocitos intraepiteliales y los que los presentan en ambas localizaciones, como se observa en las tablas 31 y 32 ($p = 0,006$).

LIE 1	n	Ki-67 Media (%)	Desviación Típica	p
Ausencia	8	11,19	6,85	0,006
Ep superficial	17	24,06	17,87	
Ep superficial y criptas	7	41,64	21,80	

Tabla 31. Expresión de Ki-67 según la localización de los linfocitos intraepiteliales únicamente en el epitelio superficial, o tanto en el epitelio superficial como en el de las criptas.

Ki-67

Bonferroni

(I) LIE_1	(J) LIE_1	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	p	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0	superficial	-12,8708	7,2485	0,259	-31,289	5,547
	1+2	-30,4580	8,7498	0,005	-52,691	-8,226
superficial	0	12,8708	7,2485	0,259	-5,547	31,289
	1+2	-17,5872	7,5924	0,083	-36,879	1,704
1+2	0	30,4580	8,7498	0,005	8,226	52,691
	superficial	17,5872	7,5924	0,083	-1,704	36,879

Tabla 32. Test de Bonferroni, para comprobar entre qué categorías son significativas las diferencias en la expresión de Ki-67 para el parámetro LIE 1- localización de los linfocitos intraepiteliales. 1+2: localización tanto en el epitelio superficial como en el de las criptas *. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Se han encontrado expresiones de Ki-67 significativamente más elevadas en las muestras con pérdida de la estructura de la pared intestinal (media de Ki-67 = 54,55%) que en las muestras en las que la estructura de la pared estaba conservada (media de Ki-67 = 19,17%) ($p < 0,01$).

La expresión de Ki-67 es significativamente superior en los casos del grupo Linfoma que presentan pleomorfismo celular (Ki-67 = 60,42%) que en los que no lo presentan (Ki-67 = 40,30%) ($p = 0,004$).

El índice de proliferación celular Ki-67 ha presentado una correlación positiva significativa y alta con el índice mitótico observado al microscopio óptico ($r = 0,746$; $p = 0,033$)

Se ha encontrado una correlación positiva entre la expresión inmunohistoquímica de Ki-67 y todos los índices de gravedad calculados. Esta

correlación es leve con el índice de actividad clínica y el índice de alteraciones endoscópicas; y elevada con el índice de gravedad de la lesión inflamatoria duodenal a nivel histopatológico, tal y como se muestra en la tabla 32.

Ki-67	Índice clínico	Índice endoscopia	Índice inflamación histológica
Correlación de Pearson (r)	0,350	0,370	0,518
Significación (p)	0,049	0,037	0,002

Tabla 32. Correlaciones significativas entre el índice de proliferación celular Ki-67 y los índices de gravedad clínica, endoscópica y de inflamación a nivel histopatológico calculados.

5.6 ESTUDIO DE LA CLONALIDAD DE LINFOCITOS T MEDIANTE EL EMPLEO DE PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

Se ha realizado PCR para amplificar la región CDR3 del gen del receptor TCR de los linfocitos T caninos, para detectar la clonalidad de estas células (Burnett y col., 2003), en todos los casos del estudio. Los resultados al correr el gel de electroforesis de manera tradicional en un gel de agarosa al 4% presentaban bandas difíciles de identificar (figura 25); por lo tanto, a partir de este momento, se van a tratar los resultados obtenidos tras utilizar el sistema automático de electroforesis capilar de alta resolución QIAxcel Advanced (QIAGEN Inc., Valencia, California, Estados Unidos).

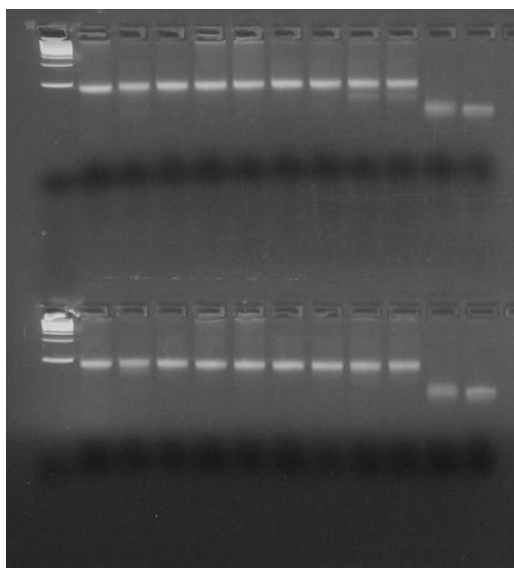


Figura 25. Gel de agarosa al 4% en el que se muestran bandas difíciles de interpretar, en cuatro muestras duplicadas, que más tarde se procesaron en QIAxcel Advanced. El pocillo de la izquierda corresponde al marcador o ladder de 100 pares de bases, y el segundo pocillo es el control positivo clonal. A la derecha del todo, dos pocillos con el control de extracción (negativo) y el control de premezcla de reactivos (también negativo). Abajo muestras duplicadas de la PCR heterodúplex.

Tras utilizar QIAxcel Advanced, pudimos observar una imagen de una banda intensa (figura 26), que se confirma en el electroferograma con un pico de entre 80-100bp (figura 27), indicador de monoclonalidad, en seis de las 32 muestras de este estudio. Las seis muestras pertenecen al grupo Linfoma. De

este modo, la PCR ha detectado como positivos el 75% de los casos de linfoma. Concretamente, han resultado positivos seis de los ocho casos incluidos en el grupo Linfoma, entre ellos, cinco de los siete que se diagnosticaron en este grupo al observar las preparaciones teñidas con H-E, y el caso que pasó del grupo DLP al grupo Linfoma al observar las muestras teñidas con CD3 y CD20 mediante técnicas inmunohistoquímicas.



Figura 26. Caso 4, grupo Linfoma. Banda intensa observada en el gel, en el sistema automático de electroforesis capilar de QIAxcel Advanced, indicadora de monoclonalidad. La tira de la izquierda (A2) se corresponde con el control positivo, mientras que los pocillos A3 y A4 corresponden con muestras repetidas del mismo caso.

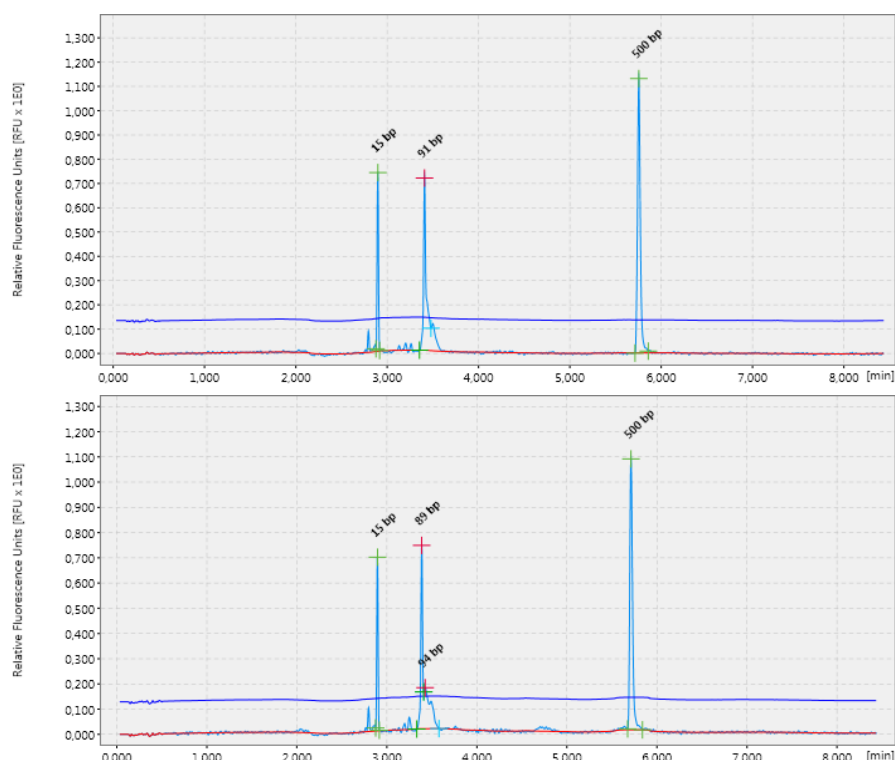


Figura 27. Electroferogramas de los casos 4 y 6, positivos monoclonales. Podemos observar un pico muy marcado, de base estrecha de 91pb (arriba), y de 89pb (abajo). En ambas imágenes observamos los marcadores de 15pb y 500pb.

Todos los casos del grupo IBD y del grupo DLP (100%) han resultado negativos, es decir, policlonales, tras la realización de la PCR. En la figura 28 podemos observar el gel de una muestra monoclonal y otra policlonal a la par, y en la figura 29 su correspondiente electroferograma. En el caso policlonal negativo observamos una banda ancha y menos intensa que la banda indicadora de monoclonalidad.

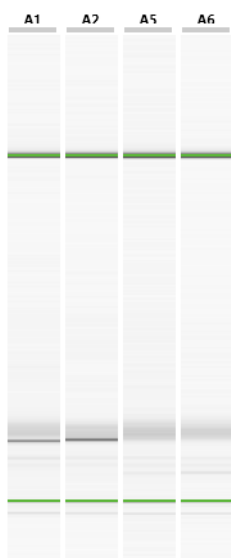


Figura 28. Gel de una muestra monoclonal, caso 7 (pocillos A1 y A2) y de una muestra policlonal, el caso 18 (pocillos A5 y A6). En el caso policlonal observamos una banda ancha y menos intensa que la del caso monoclonal.

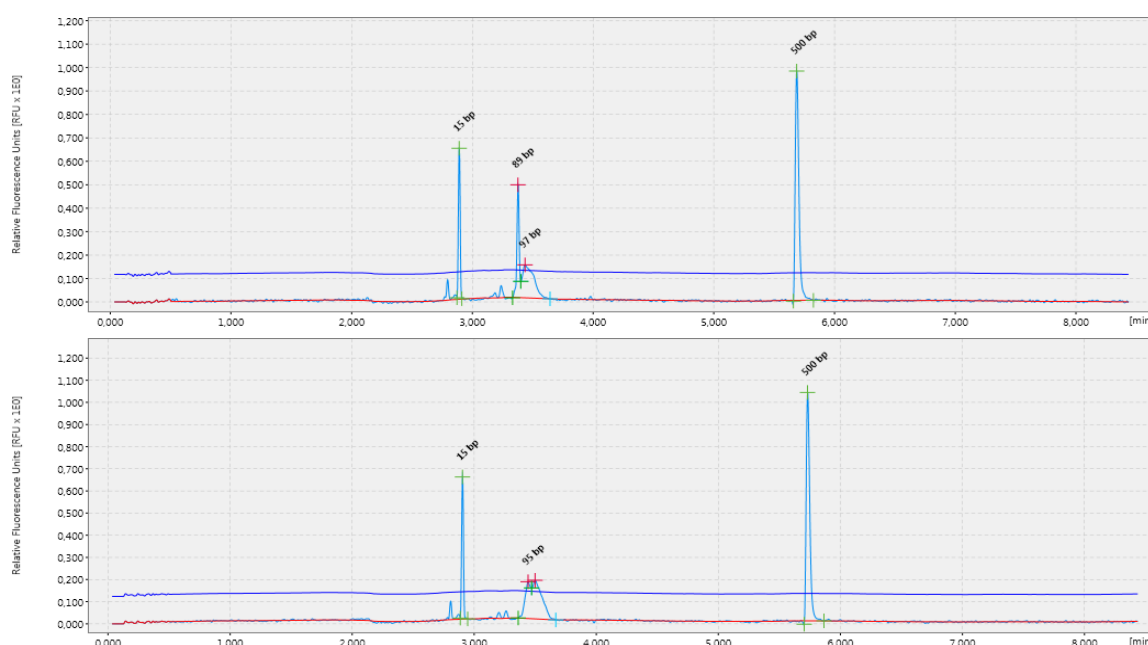


Figura 29. Electroferogramas correspondientes a las muestras del gel de la figura 28, la muestra monoclonal (en posición superior) y la policlonal (en posición inferior). En la muestra monoclonal observamos un pico marcado y de base estrecha de 89 pb, que no aparece en la muestra policlonal.

5.6.1 RELACIÓN DE LA CLONALIDAD CON PARÁMETROS CLÍNICOS Y ENDOSCÓPICOS

La monoclonalidad linfocitaria estudiada con PCR se ha relacionado con varios de los parámetros ecográficos establecidos. Tanto el engrosamiento de la pared intestinal como la pérdida de diferenciación de capas se han asociado con la presencia de monoclonalidad linfocitaria demostrada por PCR, de manera que las seis muestras monoclonales presentaron engrosamiento de la pared de intestino delgado, y en cinco de las seis se observó, además, una pérdida de diferenciación de capas en la ecografía ($p = 0,004$ y $p < 0,001$, respectivamente).

Asimismo, encontramos algunas asociaciones con los parámetros endoscópicos. Las seis muestras monoclonales en las pruebas de PCR presentan una ausencia de mucosa friable ($p = 0,002$). La presencia de un grado intenso de soluciones de continuidad visibles en la luz intestinal mediante endoscopia también se ha relacionado significativamente con la monoclonalidad de las muestras por PCR ($p = 0,027$).

5.6.2 RELACIÓN DE LA CLONALIDAD CON LOS ÍNDICES DE GRAVEDAD CLÍNICA, ENDOSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA

Se han realizado análisis estadísticos con el test t de Student entre las muestras monoclonales y policlonales para los diferentes índices de gravedad que se han calculado a lo largo de este trabajo. De este modo, se han encontrado diferencias significativas en el índice de alteración endoscópica y el índice de gravedad de la lesión inflamatoria duodenal a nivel histopatológico, tal y como se muestra en la tabla 34.

	n	Media	Desviación Típica	p
Índice endoscopia				
Muestras monoclonales	6	8,83	3,25	< 0,001
Muestras policlonales	26	6,19	3,20	
Índice de inflamación histológica				
Muestras monoclonales	6	12,33	3,67	0,010
Muestras policlonales	26	8,19	3,22	

Tabla 34. Diferencias significativas en los índices de gravedad endoscópica y de inflamación a nivel histopatológico según la clonalidad de las muestras por PCR.

5.6.3. RELACIÓN DE LA CLONALIDAD CON LOS PARÁMETROS HISTOPATOLÓGICOS Y CON Ki-67

Las seis muestras monoclonales por PCR tienen una serie de características histopatológicas significativas. Presentan un grado intenso de los parámetros histopatológicos de la WSAVA acortamiento-ensanchamiento de vellosidades y lesión epitelial en un porcentaje significativamente superior a lo esperado. Además, es más frecuente la presencia de linfocitos intraepiteliales tanto en el epitelio superficial como en el de las criptas. Estos resultados se muestran en la tabla 35.

	Porcentaje	Porcentaje esperado	p
Acortamiento vellosidades (grado 3)	50%	9,4%	0,002
Lesión epitelial (grado 3)	33,3%	6,3%	0,001
LIE en criptas y epitelio superficial	67,7%	21,9%	0,010

Tabla 35. Asociaciones estadísticamente significativas de los seis casos monoclonales en las pruebas de PCR con los parámetros histopatológicos acortamiento-ensanchamiento de vellosidades de grado grave, lesión epitelial de grado grave, y la presencia de linfocitos intraepiteliales tanto en las criptas como en el epitelio de revestimiento. Valores obtenidos tras la realización de pruebas de Chi-cuadrado y la observación de los residuos corregidos.

Si analizamos los resultados de las muestras monoclonales en comparación con las policlonales del grupo Linfoma, observamos ciertas diferencias significativas. Existe una relación significativa entre la pérdida de estructura de la pared intestinal y la presencia de clonalidad en las pruebas de PCR ($p < 0,001$), de manera que de las seis muestras que han resultado clonales, cuatro de ellas presentaban una pérdida de estructura, mientras que tan sólo una de las monoclonales presentó dicha pérdida de estructura de la pared.

Todos los casos monoclonales presentaron un infiltrado de células de tamaño grande. Sin embargo, en los otros dos casos del grupo Linfoma, que han resultado policlonales en la PCR, el tamaño de las células fue pequeño. Esta diferencia ha resultado estadísticamente significativa ($p = 0,005$).

Cinco de los seis casos monoclonales (83,33%) presentaron pleomorfismo celular, mientras que ninguno de los dos casos policlonales del grupo Linfoma lo presentaron, resultando estos datos estadísticamente significativos ($p = 0.035$).

Se han estudiado los parámetros relacionados con los linfocitos intraepiteliales, contrastándolos con los resultados de clonalidad en las pruebas de PCR, sin encontrar grandes diferencias. De los seis casos con monoclonalidad en la PCR, cinco de ellos presentan linfocitos intraepiteliales en forma de nido o placas, y el último en forma de células aisladas. En los dos casos pertenecientes al grupo de Linfoma que resultaron policlonales en las pruebas de PCR, encontramos linfocitos intraepiteliales en forma de placas.

La expresión del índice de proliferación celular Ki-67 en los seis casos clonales por PCR ha resultado significativamente mayor al de los dos policlonales del grupo Linfoma. Estos resultados se muestran en la tabla 36.

PCR	n	Ki-67 Media (%)	Desviación Típica	Mínimo	Máximo	p
Monoclonal	6	58,80	4,61	50,73	63,98	0,001
Policlonal	2	35,08	6,13	30,75	39,42	

Tabla 36. Diferencias en la expresión de Ki-67 entre las muestras monoclonales y policlonales por PCR en los casos del grupo Linfoma.

El índice de proliferación celular Ki-67 ha resultado ser significativamente superior en las muestras monoclonales que en las policlonales, también a nivel general, contando con los 32 casos incluidos en el estudio, como se muestra en la tabla 37:

PCR	n	Ki-67 Media (%)	Desviación Típica	Mínimo	Máximo	p
Monoclonal	6	58,80	11,07	50,73	63,98	<0,001
Policlonal	26	16,81	4,61	3,36	47,15	

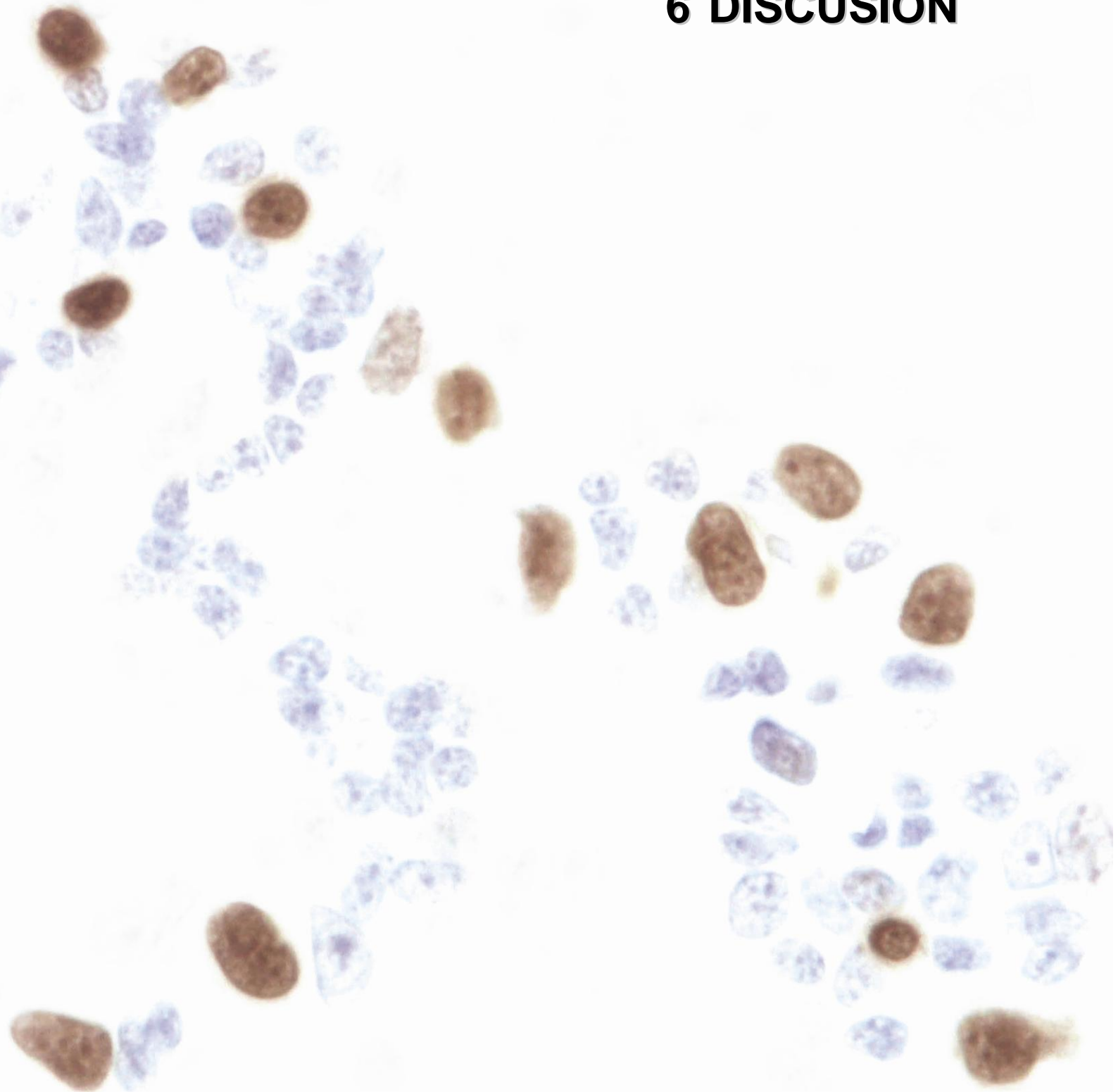
Tabla 37. Expresión de Ki-67 en las muestras monoclonales y policlonales en las técnicas de PCR.

5.7 TABLA RESUMEN DE LA EVOLUCIÓN DIAGNÓSTICA SEGUIDA CON LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS Y DE PCR

Caso	GRUPOS H-E	GRUPOS H-E + CD3 y CD20	KI-67 (%)	CLONALIDAD POR PCR	DIAGNÓSTICO FINAL
1	DLP	IBD	18,70	Policlonal	IBD
3	DLP	IBD	24,14	Policlonal	IBD
10	IBD	IBD	14,20	Policlonal	IBD
11	DLP	IBD	14,03	Policlonal	IBD
12	IBD	IBD	15,16	Policlonal	IBD
13	IBD	IBD	3,73	Policlonal	IBD
14	DLP	IBD	3,69	Policlonal	IBD
15	IBD	IBD	6,79	Policlonal	IBD
17	IBD	IBD	3,36	Policlonal	IBD
18	IBD	IBD	3,45	Policlonal	IBD
19	IBD	IBD	10,75	Policlonal	IBD
20	IBD	IBD	5,39	Policlonal	IBD
27	DLP	IBD	6,55	Policlonal	IBD
29	IBD	IBD	8,88	Policlonal	IBD
32	IBD	IBD	19,60	Policlonal	IBD
4	Linfoma	Linfoma	58,41	Monoclonal	Linfoma
5	DLP	Linfoma	50,73	Monoclonal	Linfoma
6	Linfoma	Linfoma	62,12	Monoclonal	Linfoma
7	Linfoma	Linfoma	63,98	Monoclonal	Linfoma
8	Linfoma	Linfoma	57,50	Monoclonal	Linfoma
9	Linfoma	Linfoma	60,07	Monoclonal	Linfoma
23	Linfoma	Linfoma	39,42	Policlonal	Linfoma
31	Linfoma	Linfoma	30,75	Policlonal	Linfoma
2	DLP	DLP	21,81	Policlonal	IBD
16	DLP	DLP	9,30	Policlonal	IBD
21	DLP	DLP	13,78	Policlonal	IBD
22	DLP	DLP	32,23	Policlonal	IBD
24	IBD	DLP	18,25	Policlonal	IBD
25	DLP	DLP	13,53	Policlonal	IBD
26	DLP	DLP	23,15	Policlonal	IBD
28	DLP	DLP	47,15	Policlonal	IBD
30	IBD	DLP	19,37	Policlonal	IBD

Tabla 38. Evolución del diagnóstico al estudiar las muestras teñidas con H-E, después realizando técnicas inmunohistoquímicas para CD3 y CD20, y para Ki-67; posteriormente, las pruebas de clonalidad de linfocitos T por PCR y, por último, el diagnóstico final alcanzado.

6 DISCUSIÓN



6.1 ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO

6.1.1 DISTRIBUCIÓN RESPECTO A LA EDAD Y EL SEXO

Hasta el momento, tanto el linfoma intestinal como la enfermedad inflamatoria crónica intestinal se consideran característicos de perros de edad media o avanzada (Tams, 2003; Leibman, 2003).

Los pacientes de nuestro estudio pertenecientes al grupo Linfoma presentaron una edad media de 7,56 años, similar a la media publicada por otros autores para esta enfermedad (Coyle y col., 2004; Frank y col., 2007). Algunos autores describen medias algo más altas, entre los 9 y 10,6 años (Ozaki y col., 2006; Rassnick y col., 2009; Fukushima y col., 2009). Sin embargo, el rango de edad de los perros de este estudio, de 5 a 11 años, es similar a los intervalos que encuentran estos últimos autores, si bien es más reducido que para otros. La mayor parte de los estudios encuentran perros menores de 5 años y mayores de 11, encontrándose la mayoría de casos publicados entre 1,5 y 15 años. Consideramos el reducido número de pacientes de este grupo la causa probable de un rango de edad más reducido. En general, dada la baja prevalencia del linfoma gastrointestinal, no se han publicado trabajos muy amplios al respecto, la mayoría oscilan entre un solo caso, y hasta 44 casos clínicos (Coyle y col., 2004), e incluyen linfomas en distintas localizaciones del tracto gastrointestinal, con muestras obtenidas tanto de necropsias como de biopsias quirúrgicas y endoscópicas. El presente estudio se ha centrado en los linfomas en los que existe una mayor dificultad en el diagnóstico diferencial con la enteritis crónica linfoplasmocitaria, y por ello incluye únicamente biopsias endoscópicas de duodeno de linfomas intestinales difusos.

Por otro lado, los pacientes de este estudio pertenecientes al grupo IBD presentan una media de edad muy similar a los del grupo Linfoma, de 7,17 años, con un rango algo más amplio que para los últimos, de 2 a 12 años. Si bien la media de edad encontrada en la mayoría de estudios de IBD es más baja que la encontrada en el presente trabajo (Jacobs y col., 1990; Jergens y col., 1992; Craven y col., 2004; Jergens y col., 2012), hemos de tener en cuenta que sólo han sido incluidos en este estudio los pacientes con una enteritis crónica linfoplasmocitaria de carácter grave, lo que explicaría encontrar pacientes de

mayor edad. En cuanto a la edad mínima encontrada en este estudio, de dos años, coincide con la consideración generalmente aceptada de dos años como edad mínima de presentación del IBD en el perro (Mansell y col., 2003), aunque esta enfermedad puede aparecer, de manera improbable, en perros menores de dos años (Hall y col., 2007).

Observamos que la edad no constituye un rasgo diferencial entre el linfoma intestinal y el IBD de carácter grave. Destaca el hecho de que el grupo DLP presenta una media de edad superior a los otros dos grupos, de 8,55 años, encontrándose también en este grupo animales mayores, de hasta 14 años. Dado que contamos con nueve animales en este grupo, podría tratarse simplemente de una casualidad, pero también podría deberse a que estos animales presentan un IBD muy grave, que incluso llega a sugerir un diagnóstico de linfoma, o potencialmente a evolucionar hacia él, como han sugerido algunos autores (Hall y col., 2007; Dandrieux y col., 2008; Rodríguez-Franco y col., 2010; Washabau y col., 2010; Gieger, 2011). Por lo tanto, este grupo puede albergar animales mayores que en el grupo IBD, ya que probablemente se trate de casos crónicos, en los que la enfermedad está más avanzada.

En cuanto al sexo, no hay descrita en la literatura, hasta el momento, una predisposición sexual ni para el linfoma digestivo ni para la enfermedad inflamatoria crónica intestinal canina, pese a que sí hay una mayor frecuencia de otros tipos de neoplasias intestinales en perros macho que en hembras (Jacobs y col., 1990; Leibman, 2003; Tams, 2003; Hall y col., 2007). En los perros de este estudio, encontramos un porcentaje de machos mayor que el de hembras en los tres grupos de estudio. Diversos estudios previos describen un mayor porcentaje de machos con respecto a las hembras tanto en el linfoma alimentario (Ozaki y col., 2006; Frank y col., 2007; Rassnick y col., 2009), como en el IBD (Jacobs y col., 1990; Jergens y col., 1992; Craven y col., 2004), lo que podría sugerir una cierta predisposición para este género. Sin embargo, estos datos carecen de significación, ya que no hemos comparado nuestra población con la población general de la que provienen los perros del estudio.

6.1.2. DISTRIBUCIÓN RESPECTO A LA RAZA Y EL PESO

El linfoma intestinal no se considera, a día de hoy, una enfermedad con una clara predisposición racial (Leibman y col., 2003). Algunos autores citan una mayor incidencia del linfoma, sin hacer diferenciación en cuanto a localización

anatómica, en ciertas razas como Bóxer, Sharpei, Setter, Cocker Spaniel, Scottish Terrier y Pastor Alemán (Coyle y col., 2004; Vail y col., 2007; Pastor y col., 2009; Fukushima y col., 2009). Para el linfoma digestivo, además de estas razas, hay autores que mencionan el Golden Retriever (Frank y col., 2007; Rassnick y col., 2009). En el IBD no existe tampoco predisposición racial conocida, aunque hay autores que hacen una excepción con la raza Pastor Alemán, en la que se sugiere una mayor frecuencia de presentación (Jacobs y col., 1990; Jergens y col., 1992; Guilford, 1996; Hall, 2007). Basándonos en el pequeño número de pacientes incluidos en nuestro estudio, no podemos sacar conclusión alguna referente a la distribución de estas enfermedades respecto a la raza.

Hemos analizado el peso de los perros objeto del presente estudio, tratando de perfilar las diferencias en la presentación del linfoma intestinal y el IBD. Estableciendo grupos de peso descritos previamente en la literatura (Rodríguez-Franco y col., 2002) observamos que, pese a que la distribución de los perros en cuanto al peso es muy heterogénea, en el grupo Linfoma destacan los perros de raza grande (21-30Kg de peso), que representan el 62,5% de los perros de este grupo. No hemos encontrado referencia a este dato en la literatura, y hemos de tomarlo con mucha cautela, ya que desconocemos la distribución en función del peso en la población general y, además, contamos con un número reducido de pacientes incluidos en el grupo Linfoma. Además observamos que, tomando el peso como variable cuantitativa, no encontramos diferencias significativas en el peso medio en los tres grupos de estudio.

6.2 ESTUDIO CLÍNICO

6.2.1. MOTIVO DE CONSULTA

En muy pocas ocasiones se ha prestado atención al motivo que lleva a los propietarios de los perros a acudir al veterinario. Observando nuestros resultados, constatamos que más de la mitad de los propietarios acuden por un único motivo de consulta. Sin embargo, cuando se realiza una anamnesis más detallada, en todos ellos aparece más de uno de los signos clínicos valorados. Esto puede deberse a que, frecuentemente, el motivo de consulta corresponde con el signo más grave del animal, que más llama la atención de los propietarios, y que llega a restar importancia al resto de signos clínicos. O bien, la duración prolongada en el tiempo de determinados signos clínicos puede llegar a producir un acostumbamiento del propietario, que llega a considerar normales situaciones patológicas.

Los motivos de consulta más frecuentes entre los perros del presente estudio son diarrea y vómitos, probablemente los signos clínicos más llamativos para los propietarios. La pérdida de peso o las alteraciones del apetito son raramente motivo de consulta, pese a que, como veremos más adelante, se trata de signos clínicos muy frecuentes. Es posible que la pérdida de peso ocurra de una manera más paulatina, de modo que los propietarios llegan a acostumbrarse y no supone un cambio tan llamativo y aparatoso como la aparición de vómitos o de diarrea.

Encontramos diferencias en el motivo de consulta entre los grupos de estudio. En los perros del grupo Linfoma, el signo clínico que más frecuentemente constituye el motivo de consulta es la presencia de diarrea, que llega hasta el 87,5% de los casos (tanto sola como acompañada por otros signos clínicos). En el grupo IBD, sin embargo, el vómito es algo superior a la diarrea como motivo de consulta, como lo es también como signo clínico, como veremos más adelante. Existen muy pocos artículos en la bibliografía consultada que valoren el motivo de consulta. En la enteritis crónica linfoplasmocitaria, que se engloba dentro del IBD, parece que los vómitos ocupan el primer signo entre los motivos de consulta, al igual que ocurre en nuestro estudio (Rodríguez-Franco y col., 2002). En este caso consideramos que las diferencias en el motivo de

consulta entre los grupos Linfoma e IBD se deben a la diferente prevalencia de los signos clínicos entre ambos grupos, que se comentan a continuación.

Llama la atención la alta frecuencia de diarrea como motivo de consulta en el grupo DLP, y la baja frecuencia de vómitos. Cuando analizamos el cuadro clínico de estos animales, efectivamente, la diarrea aparece en todos ellos, mientras que los vómitos son muy poco frecuentes. Hemos de tener en cuenta que estos animales se han elegido cuidadosamente, tras el estudio de las biopsias intestinales, por presentar características histopatológicas que hacen necesario el diagnóstico diferencial entre linfoma intestinal y la enfermedad inflamatoria crónica intestinal.

6.2.2. SIGNOS CLÍNICOS

Existen numerosos signos clínicos descritos tanto en el linfoma intestinal como en el IBD en el perro (Jacobs y col., 1990; Jergens y col., 1992; Rodríguez-Franco y col., 2002; Tams, 2003; Craven y col., 2004; Frank y col., 2007). Desde que comenzamos este trabajo decidimos centrarnos en los que consideramos más representativos, que son: diarrea crónica, vómito crónico, pérdida de peso y alteraciones del apetito.

En el grupo Linfoma los signos clínicos más frecuentes son la diarrea y la pérdida de peso, presentes en casi la totalidad de los pacientes. Como hemos comentado con anterioridad, pocos trabajos estudian a fondo el cuadro clínico del linfoma digestivo canino, y ninguno se centra en el linfoma intestinal diagnosticado en biopsias endoscópicas de duodeno, como es el caso del presente estudio. Hay autores que citan el vómito como el signo clínico más frecuente en el linfoma gastrointestinal, bien en primer lugar, o compartiendo frecuencia con la diarrea (Ozaki y col., 2006; Frank y col., 2007; Rassnick y col., 2009). Sin embargo, las diferencias en cuanto a prevalencia de la pérdida de peso y la diarrea o la inapetencia son muy pequeñas en estos trabajos. El estudio de Miura y colaboradores encuentra, al igual que este estudio, la pérdida de peso como signo más frecuente, seguida de diarrea, aunque el 42% de los casos eran linfomas en forma de masa abdominal (Miura y col., 2004). En los resultados de este estudio, destaca la baja frecuencia de vómitos (37,5%) en el grupo Linfoma. Puede deberse a que el resto de estudios incluyen linfomas gastrointestinales de distintas localizaciones, y este signo es mucho más frecuente en los linfomas gástricos, aunque esta es la localización menos

frecuente del linfoma gastrointestinal. Valli describe por primera vez el linfoma T tipo enteropatía, refiriéndose al hasta entonces llamado linfoma T intestinal, y cita como principal signo clínico la pérdida de peso en esta entidad concreta, al igual que ocurre en el presente estudio, y destaca también la presencia de anorexia, diarrea recurrente y vómitos como signos clínicos comunes (Valli, 2007).

En el caso del IBD, hay autores que señalan los vómitos como signo clínico más frecuente cuando el tramo afectado es el intestino delgado (Craven y col., 2004; García-Sancho y col., 2007), aunque otros destacan la diarrea como signo clínico principal (Jacobs y col., 1990). La pérdida de peso también es un signo clínico muy común en el IBD canino (Jacobs y col., 1990; Jergens y col., 1992; Craven y col., 2004), como ocurre en los perros de nuestro estudio. Se considera que, tanto el linfoma intestinal como la enteritis crónica linfoplasmocitaria se encuentran entre las causas más comunes del síndrome de malabsorción, responsable de una u otra manera de la pérdida de peso y la diarrea de los pacientes de este estudio. Este síndrome aparece como consecuencia de la pérdida de enzimas del ribete en cepillo, la reducción en la superficie de la mucosa para la absorción, la pérdida selectiva de mecanismos de transporte, y las alteraciones en la estructura normal de la lámina propia. La secreción de citoquinas presente en casos de inflamación crónica es responsable de la pérdida prematura de enterocitos inmaduros desde las vellosidades intestinales, y además, es probable que el propio infiltrado celular cree una barrera entre la superficie mucosa y los capilares, interfiriendo con la normal absorción y difusión de fluidos y solutos (Guilford, 1996; Williams, 1996). Por todos estos mecanismos, se produce una retención de nutrientes y otros elementos en la luz intestinal, que conducen a una diarrea de tipo osmótico. Además, la retención de ciertos nutrientes, junto con la liberación de mediadores de la inflamación llevan a un incremento de la secreción intestinal, que conduce a la aparición de una diarrea de tipo secretor (Elwood, 1999).

Las alteraciones del apetito se encuentran también relacionadas con la presencia del síndrome de malabsorción. En el caso de incremento del apetito se producirá de una forma directa, como mecanismo de compensación al déficit energético para cubrir los requerimientos nutricionales y así mantener el peso corporal (Dunn, 1999); en el caso de la anorexia, por dolor derivado del propio cuadro clínico. La anorexia aparece en un gran número de patologías, entre las que se incluye la inflamación gastrointestinal y el dolor abdominal (Dunn, 1999). Es probable que en las dos patologías que estudiamos en este trabajo aparezca

dolor que, desde el sistema nervioso central, se traduce en la disminución de la estimulación del centro del apetito o en el aumento de la actividad del centro de la saciedad. Además, se ha observado que la presencia de náuseas o vómitos suele acompañarse de anorexia o inapetencia, lo que podría indicar una interconexión en el hipotálamo entre los centros de control de la ingestión y el centro del vómito (Dunn y col., 1999). Las alteraciones en la actividad o actitud, por su parte, siempre aparecen acompañadas del resto de signos clínicos, de manera que éstos justificarían una afectación del estado general con cambios secundarios en la actividad y actitud del animal. Muchas veces las alteraciones en la actitud no son constantes sino puntuales, y relacionadas con la aparición del resto de signos clínicos.

La presencia de vómitos en estas dos enfermedades puede explicarse por la presencia de receptores periféricos del vómito localizados por todo el organismo, especialmente en las vísceras abdominales, y en concreto en el duodeno, que incluso se ha llegado a denominar “órgano de la náusea”. La presencia de un infiltrado inflamatorio o neoplásico es, probablemente, responsable de la estimulación directa del vómito a través de vías aferentes de tipo vagal (Guilford y col., 1996). Además, en la mayoría de ocasiones se trata de vómitos biliosos con estómago vacío, que se producen por reflujo duodenal hacia el antro pilórico como consecuencia de una incompetencia o mal funcionamiento del píloro inducido por el proceso inflamatorio crónico o el infiltrado neoplásico presente en intestino delgado. El reflujo duodenal contiene bilis, así como jugo pancreático y secreciones duodenales. Este reflujo a nivel del antro pilórico disuelve la capa de moco gástrico protector, provocando un proceso inflamatorio sobre la mucosa. Además, este contenido duodenal en el estómago tiene un efecto alcalinizante sobre el antro pilórico dando lugar a una hipomotilidad antral (retardo en el vaciado gástrico) y a una hipersecreción de gastrina que va a conducir a un aumento en la secreción de ácido clorhídrico (HCl) por estímulo de los quimiorreceptores antrales. La unión de dichos fenómenos (destrucción de la capa de moco protector, hipomotilidad del antro pilórico e hipersecreción de HCl), son los que van a dar lugar al desarrollo de una gastritis crónica antral y, como consecuencia final, la aparición de vómitos (García-Sancho y col., 2007).

Tanto la pérdida de peso como las alteraciones en la actividad/actitud son muy frecuentes en todos los grupos de este estudio. La diarrea es también muy frecuente en todos los grupos, aunque algo menos en el grupo IBD (66,7%), y las alteraciones del apetito presentan porcentajes similares en todos los grupos

(tabla 10 en resultados). El signo clínico en el que encontramos mayores diferencias entre grupos es el vómito, muy frecuente en el grupo IBD, y menos frecuente en el grupo Linfoma, y en el grupo DLP. Sin embargo, al realizar tablas de contingencia y análisis de Chi-cuadrado teniendo en cuenta las diversas categorías de frecuencia de vómitos, las diferencias entre grupos no resultan estadísticamente significativas

La mayoría de autores coinciden en que el vómito y la diarrea se encuentran entre los signos observados con mayor frecuencia en los perros con enfermedad inflamatoria crónica intestinal, describiendo también la pérdida de peso y las alteraciones del apetito con mucha frecuencia (Jacobs y col., 1990; Jergens y col., 1992; Rodríguez-Franco y col., 2002; Tams, 2003; Craven y col., 2004; Jergens y col., 2012). Algunos de los trabajos describen frecuencias menores en algunos de los signos clínicos estudiados en este trabajo, probablemente debido a que estamos incluyendo casos graves de esta enfermedad. Los trabajos realizados hasta el momento confieren una menor importancia a las alteraciones en la actividad/actitud que nosotros, quizá debido a que hemos realizado una valoración expresa de este signo, que pudiera pasar desapercibido en estudios previos.

Podemos concluir, coincidiendo con algunos autores, que no existen signos clínicos que permitan diferenciar entre linfoma intestinal e IBD en el perro (Guilford, 1996; Tams, 2003; Hall, 2007).

6.2.3. ÍNDICE DE ACTIVIDAD CLÍNICA

Con la intención de estudiar la gravedad del cuadro clínico de los animales del estudio, y de cara a poder establecer comparaciones entre grupos, hemos calculado un índice de actividad de estas enfermedades. Dado que no existen índices de actividad publicados en la literatura para el linfoma intestinal canino, nos hemos basado en los que existen para la enfermedad inflamatoria crónica intestinal (Jergens y col., 2003; Rodríguez-Franco y col., 2004; Allenspach y col., 2007), con puntuaciones similares a las que utilizan estos autores, e incluyendo los signos relevantes entre los perros de los tres grupos de estudio, cuidadosamente categorizados en función de su intensidad. El índice de actividad propuesto en este trabajo incluye cinco signos clínicos: vómitos, diarrea, pérdida de peso, alteraciones del apetito y alteraciones en la actividad/actitud.

Cuando aplicamos nuestro índice de actividad a los perros objeto de nuestro estudio, la gran mayoría de ellos muestran un índice elevado, mayor de 6 puntos, lo que corresponde a una enfermedad inflamatoria crónica intestinal grave, o a un linfoma intestinal. Sin embargo, uno de los perros del grupo Linfoma presenta un índice de actividad de 2, y varios del grupo IBD presentan índices bajos. Creemos que esto puede a varios motivos: por un lado, algunos de los propietarios pueden pasar por alto ciertos signos clínicos de sus perros; por otro, la persona que acude a la consulta puede no pasar el suficiente tiempo con el perro, o bien, puede darse que la existencia de un signo llamativo haga que los propietarios centren la atención en ese síntoma y el resto pasen desapercibidos.

El grupo Linfoma presenta un índice de actividad medio de 8, mientras que este índice es de 6,4 en el grupo IBD, y de 6 en el grupo DLP. Sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas, lo que confirma que, aunque en algunos casos el linfoma intestinal presente signos clínicos más graves, ambas enfermedades presentan un cuadro clínico similar, y el diagnóstico diferencial hará necesaria la realización de pruebas complementarias, y la toma de biopsias intestinales (Willard, 2010; Washabau y col., 2010; Gieger, 2011).

El índice de actividad medio más bajo lo encontramos en el grupo DLP, aunque las diferencias son pequeñas respecto a los otros dos grupos. Hemos de recordar que los perros se han incluido en este grupo por la imagen histopatológica de las lesiones y no por la gravedad clínica. Está descrito que los signos clínicos en el IBD son muy variables, que difieren según la extensión de la enfermedad, y que muchas veces no se corresponden con la gravedad de las lesiones histológicas (Allenspach y col., 2006; García-Sancho y col., 2007; Washabau y col., 2010).

Al igual que con la sintomatología clínica, con este índice de actividad clínica no hemos encontrado diferencias que nos permitan diferenciar entre linfoma intestinal e IBD en el perro.

6.2.4. PALPACIÓN ABDOMINAL

La palpación abdominal es importante, y debe realizarse sistemáticamente en la exploración física de los animales, como parte del protocolo diagnóstico de múltiples enfermedades gastrointestinales, entre ellas el linfoma intestinal y la enfermedad inflamatoria crónica intestinal. En este trabajo hemos recogido datos de la palpación de gases y líquidos en el interior de las asas intestinales, engrosamiento de las asas intestinales y dolor abdominal.

La palpación de gases y líquidos en el interior de las asas intestinales es algo superior en el grupo Linfoma que en el grupo IBD, lo que consideramos se corresponde con la mayor frecuencia de diarrea en el grupo Linfoma, aunque no existe una relación estadísticamente significativa.

El dolor abdominal, frecuentemente descrito tanto en el linfoma como en el IBD, está presente en el 40% de los perros del grupo IBD, y en el 37,5% del grupo Linfoma. Estos porcentajes, en el grupo Linfoma, son similares a los que describen otros autores (Frank y col., 2007; Rassnick y col., 2009). En el IBD, aunque hay autores que describen una frecuencia menor (Jacobs y col., 1990; Jergens y col., 1992), otros describen frecuencias similares (Rodríguez-Franco y col., 2002), y hemos de tener en cuenta que nuestro grupo IBD constituye una población muy concreta de perros con enfermedad inflamatoria crónica intestinal de grado grave.

El engrosamiento de las asas intestinales observado mediante palpación abdominal es poco frecuente en los tres grupos de estudio, con porcentajes similares, en torno al 15%. Se trata de un dato que debe ser confirmado mediante diagnóstico por imagen, por lo tanto se comentará al discutir los resultados de ecografía.

Los resultados de la palpación abdominal muestran porcentajes de presentación muy similares en los tres grupos de estudio, por lo que podemos afirmar que estos datos aportan poca información de cara a un diagnóstico diferencial entre ambas enfermedades.

6.2.5. ANALÍTICA SANGUÍNEA

La alteración más frecuente que encontramos en la analítica sanguínea de los perros de este estudio es la hipoproteinemia. El IBD y el linfoma intestinal se encuentran entre las causas más frecuentes de enteropatía con pérdida de proteínas (Tams, 2003; Peterson y col., 2003). De esta manera, lo que ocurre es la pérdida de proteínas (albúminas y globulinas) hacia la luz intestinal, manteniéndose el cociente albúmina/globulina en torno a 1. En nuestro estudio la hipoproteinemia es más frecuente en el grupo Linfoma que en el grupo IBD, tratándose de diferencias que no son significativas estadísticamente. En el caso del linfoma intestinal, nuestro porcentaje (62,5%) coincide con el publicado por otros autores. Frank y colaboradores describen la presencia de hipoproteinemia en el 66,7% de los perros (Frank y col., 2007), y Rassnick y colaboradores en el 61% (Rassnick y col., 2009) y, aunque hay autores que describen porcentajes algo más bajos (Miura y col., 2004), se considera que la mayoría de estudios presentan porcentajes entorno al 61-80% (Gieger, 2011). En el caso del IBD, existen en la bibliografía cifras de hipoproteinemia muy variables, sin embargo, los autores coinciden en que es más frecuente en las formas graves de la enfermedad, como es el caso de los perros del grupo IBD de nuestro estudio, y además se asocia con un peor pronóstico (Jacobs y col., 1990; Peterson y col., 2003; Craven y col., 2004; Allenspach y col., 2007; Jergens y col., 2012). Craven y colaboradores describen la presencia de hipoproteinemia hasta en el 65% de los casos (Craven y col., 2004).

Además de la hipoproteinemia, se han detectado, de manera menos frecuente, alteraciones en el hemograma. Estas alteraciones incluyen leucocitosis con neutrofilia y anemia. La anemia es considerablemente más frecuente en el grupo Linfoma (37,5%) que en el grupo IBD (13,3%), mientras que el grupo DLP presenta un porcentaje muy parecido al del grupo Linfoma (33,3%). La mayoría de autores coinciden en afirmar que el hemograma de los perros con enfermedad inflamatoria crónica intestinal no suele presentar alteraciones (Tams, 1992; Tams, 2003; Guildford, 1996; García-Sancho y col., 2007), aunque tanto la anemia como la leucocitosis están descritas entre los hallazgos en el hemograma (Guildford, 1996; Jergens y col., 2012). En el Linfoma gastrointestinal existen alteraciones en el hemograma más frecuentemente que en el IBD. Frank y colaboradores señalan la presencia de anemia en el 36,6% de los casos (Frank y col., 2007), porcentaje altamente parecido al obtenido en este estudio, aunque otros estudios no describen la presencia de anemia (Miura y col., 2004). En cuanto a la aparición de neutrofilia, en los animales de este estudio se

da en el 37,5% de los perros del grupo Linfoma, en el 20% de los perros del grupo IBD, y en el 22,2% de los perros del grupo DLP. Esta alteración se asocia con lesiones intestinales ulcerativas o erosivas (Jergens y col., 2012), cuya presencia, como veremos más adelante, es relativamente común entre los perros de nuestro estudio, ya que se trata de casos graves. Trabajos previos describen resultados de este parámetro muy similares a los que encontramos en el grupo Linfoma en este estudio (Miura y col., 2004; Frank y col., 2007).

En nuestro estudio, se han encontrado ciertas asociaciones entre el cuadro clínico de los animales y los parámetros hematológicos. Concretamente, la presencia de anemia se ha relacionado con una alteración en la actitud de los animales, y una pérdida de peso más grave. Además, el descenso en los valores de hematocrito se ha relacionado con un índice de actividad clínica superior. Pese a que es natural que un animal anémico presente una condición física peor, y una actividad disminuida, no se han encontrado datos específicos al respecto en la bibliografía consultada.

Las diferencias que existen en el resto de los parámetros hematológicos y bioquímicos entre los grupos de estudio no han resultado estadísticamente significativas, lo que confirma la necesidad de un diagnóstico diferencial que incluya otras pruebas complementarias y la toma de biopsias intestinales.

6.2.6. ECOGRAFÍA ABDOMINAL

La ecografía abdominal es un método útil para orientar el diagnóstico de linfoma intestinal, así como para determinar la extensión del proceso y descartar la coexistencia de otras patologías (Bradley, 2009; Gaschen y col., 2011). La imagen ecográfica de linfoma intestinal e IBD puede superponerse, pero tomar consciencia de los rasgos más frecuentes en una u otra enfermedad puede ayudarnos a interpretar los hallazgos ecográficos. Además, en el caso de que se plantee la endoscopia como método diagnóstico, realizar una ecografía abdominal previa permite asegurar que las lesiones infiltrativas se encuentran al alcance de una exploración endoscópica, ya que, como se ha comentado, el endoscopio no alcanza porciones distales de yeyuno e íleon (Washabau y col., 2010). Todos los casos que se presentan en este trabajo se han elegido por la presencia de una enfermedad intestinal difusa, por lo tanto no se han diagnosticado lesiones en forma de masa, y tampoco afectación de otros órganos de la cavidad abdominal. Se ha valorado el engrosamiento de la pared

intestinal, la pérdida de diferenciación de capas, y la presencia de linfadenopatías mesentéricas. No se ha encontrado ninguna alteración que aparezca de forma exclusiva en el grupo Linfoma, de manera que tanto en el grupo Linfoma como en el grupo IBD se han encontrado alteraciones en los tres parámetros valorados, como ya había sido descrito en otros estudios (Penninck y col., 2003; Gaschen y col., 2011). Sin embargo, las alteraciones han resultado más frecuentes en el grupo Linfoma que en el grupo IBD para los tres parámetros.

Las diferencias entre los grupos Linfoma e IBD han resultado estadísticamente significativas tanto en el engrosamiento de la pared intestinal como en la pérdida de diferenciación de capas, resultados que respaldan publicaciones previas (Penninck y col., 2003). Entre los casos de nuestro estudio, el engrosamiento de la pared intestinal ha sido el hallazgo más común, siendo muy frecuente en el grupo Linfoma (87,5%), pero también bastante frecuente en el grupo IBD (40%), debido simplemente a los cambios inflamatorios que se producen. La pérdida de diferenciación de capas sólo aparece en uno de los casos del grupo IBD, pero es menos habitual que el parámetro anterior en el grupo Linfoma (62,5%).

Las linfadenopatías mesentéricas han sido el hallazgo ecográfico menos frecuente, y las diferencias entre grupos no han resultado estadísticamente significativas. Estudios previos describen igualmente que este parámetro es más frecuente en procesos neoplásicos que inflamatorios, sin llegar a alcanzar la significación estadística (Penninck y col., 2003), algo que también ha ocurrido en un estudio en la especie felina (Zwingenberger y col., 2010).

Nuestros resultados muestran que la imagen ecográfica del linfoma intestinal difuso y del IBD grave puede ser muy parecida, como ya habían afirmado otros autores (Penninck y col., 2003; Gaschen y col., 2011). Sin embargo, es interesante tener en cuenta que existen alteraciones, como el engrosamiento de la pared intestinal y la pérdida de diferenciación de capas, más comunes en el linfoma intestinal, de manera que nos pueden ayudar a orientar el diagnóstico.

Un resultado que nos ha resultado inesperado, es la escasa presencia de alteraciones ecográficas en el grupo DLP. Ninguno de los casos del grupo DLP presenta pérdida de diferenciación de capas o linfadenopatías mesentéricas, y sólo el 22,2% presentan un engrosamiento de la pared intestinal. En este caso

los hallazgos ecográficos no significarían la inclusión inmediata de estos casos en el grupo IBD, pero podrían orientar el diagnóstico en ese sentido, indicando la necesidad de un estudio histopatológico.

6.3 ESTUDIO ENDOSCÓPICO

6.3.1. TOMA DE MUESTRAS

Se ha elegido la endoscopia digestiva como método para la obtención de biopsias en este estudio. Se han tomado múltiples biopsias (de seis a ocho) de diferentes zonas de duodeno en cada caso, teniendo en especial consideración la toma de biopsias adecuadas (Willard y col., 2001; Willard y col., 2008). Willard y colaboradores describen hasta un 23% de las 200 biopsias intestinales que estudian como inapropiadas para su diagnóstico (Willard y col., 2001). En este trabajo, todos los casos las biopsias de duodeno han incluido más de tres vellosidades intestinales y en profundidad se han extendido prácticamente hasta la muscular de la mucosa, considerándose adecuadas para su diagnóstico, aunque esto no implica que la calidad de las biopsias fuera, en todos los casos, inmejorable. En el presente estudio se ha seguido, además, una cuidadosa orientación de las muestras que ha permitido la correcta evaluación de las mismas, observándose suficiente lámina propia (Willard y col., 2010).

6.3.2 PARÁMETROS ENDOSCÓPICOS EN INTESTINO DELGADO

Resulta difícil la estandarización de parámetros y formularios para la valoración endoscópica de lesiones gastrointestinales. Recientemente se han publicado una serie de parámetros, que tratan de unificar criterios respecto a la gravedad de la imagen endoscópica de la inflamación intestinal (Day y col., 2008; Washabau y col., 2010), en los que nos hemos basado, añadiendo algunos otros, en este estudio.

En el 100% de los perros estudiados se observaron lesiones macroscópicas por endoscopia en intestino delgado, de mayor o menor intensidad. Esto era de esperar dado que los animales se eligieron por presentar una enfermedad intestinal grave. Las lesiones halladas con una mayor frecuencia en duodeno fueron la presencia de una mucosa engrosada, irregular y congestiva, encontrándose diferencias en la intensidad de estos parámetros entre los grupos de estudio. Los tres parámetros son de grado intenso con mayor frecuencia en el grupo Linfoma que en el grupo IBD, presentando el grupo DLP

resultados variables, incluso superiores al grupo Linfoma en el parámetro mucosa engrosada (gráfico 6 en resultados). Sin embargo, las diferencias entre grupos para estos parámetros no alcanzan la significación estadística. Algunos autores consideran que no se debe prestar importancia al hallazgo aislado de signos de hiperemia en la mucosa, ya que con el simple paso del endoscopio podemos estar provocando su aparición en la mucosa inflamada de estos perros (Roth y col., 1990). En este estudio se ha realizado la valoración de la mucosa duodenal siempre cuidadosamente antes del paso del endoscopio, y no tras él.

Todavía no existen estudios que valoren la utilidad de los parámetros establecidos por la WSAVA (Day y col., 2008), y no existen parámetros estandarizados para valorar la imagen endoscópica del linfoma intestinal, por lo que existe cierta variabilidad en la apariencia endoscópica descrita en perros con las enfermedades objeto de nuestro estudio. Debemos tener en cuenta, además, la subjetividad de los endoscopistas al realizar la valoración de la mucosa, las diferencias individuales entre los perros, o incluso los propios aparatos de endoscopia, que pueden mostrar imágenes ligeramente diferentes. Todos estos factores hacen que sea difícil comparar resultados entre estudios. Sin embargo, a grandes rasgos, los estudios previos a la publicación de estos estándares encuentran hallazgos similares a los encontrados en este trabajo (Roth y col., 1990; Allenspach y col., 1992; Tams, 2003; Miura y col., 2004; Allenspach y col., 2007; García-Sancho y col., 2007; Jergens y col., 2012). Algunos autores coinciden en que el aspecto endoscópico de las lesiones en un linfoma intestinal, cuando éste aparece de forma difusa, es el de una mucosa irregular, que recuerda a las lesiones presentes en el IBD (Roth y col., 1990; Tams, 2003; Miura y col., 2004; Washabau y col., 2010).

Entre los hallazgos frecuentes descritos en la imagen macroscópica del IBD, además de una mucosa intestinal irregular y/o congestiva, destaca la existencia de una mucosa friable a la toma de biopsias, así como de soluciones de continuidad (Roth y col., 1990; Allenspach y col., 1992; Allenspach y col., 2007; García-Sancho y col., 2007; Jergens y col., 2012). Entre los perros del grupo IBD de nuestro estudio la mucosa es friable en un gran número de ellos (73,3%), lo que es significativamente menos frecuente en el grupo Linfoma, en el que sólo aparece en un caso. La presencia de mucosa friable es más frecuente entre los perros del grupo IBD de nuestro estudio que en otros estudios, al igual que ocurre con la mucosa engrosada, irregular y congestiva (Jergens y col., 1992; Yamasaki y col., 1996; Allenspach y col., 2007), probablemente debido a que los perros de este estudio se han elegido por ser IBD de carácter grave. Las

soluciones de continuidad son frecuentes en el grupo IBD, pero aún lo son más en el grupo Linfoma (gráfico 7 en resultados), aunque sin llegar a ser diferencias significativas. Tampoco son significativas las diferencias encontradas en la presencia de puntos blancos, pese a que son más frecuentes en el grupo Linfoma que en el grupo IBD, sin ser de todos modos muy frecuentes. Estos puntos blancos se deben, probablemente, a la presencia linfangiectasias en las vellosidades intestinales, que se estudiarán desde un punto de vista histopatológico (García-Sancho y col., 2011).

No existen trabajos que den descripciones detalladas de la imagen endoscópica de un linfoma intestinal de tipo difuso, como es el caso de este trabajo, y no se ha encontrado en la bibliografía consultada ninguna referencia a una consistencia de la mucosa dura a la toma de biopsias, presente en la mitad de los casos del grupo Linfoma del presente trabajo, y en ninguno de los IBD. Miura y colaboradores describen una pobre distensibilidad y elasticidad de la pared duodenal a la insuflación de aire durante la endoscopia en cuatro de los siete linfomas gastrointestinales que estudian (Miura y col., 2004). Consideramos éste un parámetro significativo en la valoración endoscópica de estas enfermedades, y que puede ayudar a orientar el diagnóstico hacia un linfoma intestinal en el caso de encontrarse presente. El otro parámetro que nos resulta orientativo es la presencia de una mucosa friable, que orienta el diagnóstico hacia un proceso inflamatorio. Sólo el trabajo de Roth y colaboradores hace referencia a la existencia de una mucosa friable en el linfoma intestinal, siendo menos frecuente que en procesos inflamatorios (Roth, 1990). En nuestro estudio, tan sólo uno de los casos del grupo Linfoma presenta mucosa friable.

En el grupo DLP encontramos una mucosa friable en el 66,7% de los casos, lo que correspondería a un hallazgo sugestivo de IBD o, más bien, muy poco sospechoso de linfoma intestinal. Encontramos una mucosa dura en uno de los casos del grupo DLP, lo que podría sugerir la presencia de un linfoma intestinal. En todos los casos, los hallazgos confirman la necesidad de realizar un estudio histopatológico de las biopsias obtenidas mediante endoscopia. En este grupo la presencia de soluciones de continuidad y de un grado intenso de irregularidad de la mucosa es menos frecuente que en los otros dos grupos, y la presencia de puntos blancos o de un grado intenso de mucosa congestiva es más frecuente, sin tratarse de diferencias estadísticamente significativas.

Hemos calculado un índice de gravedad endoscópica, incluyendo los parámetros que aparecen en las dos enfermedades, de cara a poder valorar si

éstos eran significativamente más graves en el caso del linfoma intestinal o del IBD. De este modo, el índice incluye: engrosamiento, irregularidad y congestión de la mucosa intestinal, así como la presencia de soluciones de continuidad. Las diferencias entre grupos han resultado prácticamente inexistentes, aunque en el grupo Linfoma las puntuaciones son ligeramente superiores. Esto confirma que la imagen endoscópica general puede ser muy similar entre ambas patologías, de modo que los únicos parámetros que pueden ayudarnos a orientar el diagnóstico son la presencia de una mucosa friable o de una mucosa dura a la toma de biopsias. No podemos contrastar los resultados obtenidos en este índice con bibliografía previa, pero sí confirmar, una vez más, la similitud en la imagen endoscópica entre ambas enfermedades, ya descrita por otros autores (Roth y col., 1990; Tams, 2003; Miura y col., 2004; Washabau y col., 2010).

La mayoría de autores relatan la ausencia de correlación entre la intensidad de las lesiones macroscópicas observadas por endoscopia y el índice de actividad en perros con IBD (Allenspach y col., 2007; García-Sancho y col., 2007). No existe un índice de actividad publicado para el linfoma intestinal canino, de modo que no se han establecido correlaciones en esta enfermedad. Sin embargo, en el presente trabajo se han encontrado diferencias significativas en el índice de actividad clínica entre los casos con mucosa de consistencia dura a la toma de biopsias y los que no la presentaron. Esto puede deberse, lógicamente, a que los perros que presentaban mucosa dura pertenecían, todos menos uno, al grupo Linfoma y, como ya se ha comentado en apartados anteriores, el grupo Linfoma presenta un índice de actividad clínico mayor al de los otros dos grupos. Sin embargo, las diferencias en el índice de actividad no alcanzaban la significación estadística. Consideramos que el parámetro mucosa dura es un parámetro muy interesante, que no es evaluado en ninguna de las referencias bibliográficas consultadas, y podría constituir un buen indicador de la gravedad de la enfermedad y orientar el pronóstico, y que podría utilizarse en futuros estudios, si bien necesita de una confirmación histopatológica.

Observando el resto de hallazgos clínicos, se han encontrado diferencias significativas en varios parámetros endoscópicos según la pérdida o conservación de la diferenciación de capas a nivel ecográfico. Los perros que presentaban pérdida de diferenciación de capas a nivel ecográfico presentaban significativamente en menor medida una mucosa friable a la toma de biopsias, y eran más frecuentes las soluciones de continuidad de grado intenso. Creemos que esto se debe a que tanto la ausencia de mucosa friable como la pérdida de

diferenciación de capas son significativamente más frecuentes en el grupo Linfoma, así como la presencia de soluciones de continuidad de grado intenso.

No podemos olvidar que, pese a que la imagen macroscópica de las lesiones puede ofrecernos cierta información, la finalidad última de la endoscopia es obtener biopsias adecuadas para realizar un posterior estudio histopatológico, necesario para confirmar el proceso inflamatorio o neoplásico (Roth y col., 1990).

6.4 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Enfrentarnos a la valoración histológica del duodeno de perros con desórdenes linfoproliferativos no ha resultado sencillo. En términos generales, existe una falta de uniformidad de criterios que clasifican estas enfermedades, y a esto se añade que en el presente trabajo estamos tratando de comparar dos enfermedades diferentes, como son la enteritis crónica linfoplasmocitaria grave y el linfoma intestinal. En este trabajo se ha conseguido tomar biopsias de calidad adecuada, ya que biopsias de calidad dudosa pueden suponer un inconveniente añadido que dificulta el diagnóstico diferencial de ambas enfermedades. Pero, aún así, el diagnóstico de biopsias endoscópicas no resulta sencillo.

Un estudio pone de manifiesto fuertes inconsistencias en la interpretación de biopsias intestinales entre distintos patólogos, incluso considerando patológico el tejido intestinal de perros clínicamente sanos. Este estudio se llevó a cabo por cinco patólogos de cuatro instituciones diferentes (Willard y col., 2002). Cuando se publicó este trabajo no existían criterios uniformizados para la valoración de las biopsias intestinales. En el año 2008, Day y colaboradores publican, en un esfuerzo común del Grupo de Estandarización Gastrointestinal de la Asociación Mundial de Veterinaria de Pequeños Animales (WSAVA) una serie de parámetros estandarizados para la clasificación de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal, que se propusieron para su utilización y generalización a nivel mundial, de modo que se pudiesen empezar a comparar estudios de diferentes instituciones (Day y col., 2008), y que posteriormente amplían definiendo la normalidad histopatológica del tracto gastrointestinal (Washabau y col., 2010). Sin embargo, dos años más tarde de la publicación de estos parámetros, Willard y colaboradores, en un estudio en el que participan varios países, demuestran que incluso utilizando estos estándares sigue existiendo un acuerdo muy pobre en la interpretación de biopsias endoscópicas de intestino delgado que, en este caso, estaba asociado con la institución de procedencia de las muestras, de manera que sugieren la estandarización del procesado y teñido de las muestras (Willard y col., 2010). Otro trabajo coincide en la dificultad de aplicación de estos esquemas (Simpson y col., 2011). No se han encontrado más trabajos que valoren la utilidad de los parámetros propuestos (Day y col., 2008).

En el presente trabajo se han utilizado los parámetros estandarizados de la WSAVA (Day y col., 2008) para la valoración de los cambios inflamatorios, tanto de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal, como del linfoma intestinal, que presentaba, en todos los casos de este estudio, un proceso inflamatorio asociado. Además, se han valorado otros parámetros que, fruto de la experiencia de nuestro grupo de trabajo de Gastroenterología en Pequeños Animales y de la bibliografía consultada, se han considerado interesantes para la comparación de ambas enfermedades, y la tipificación de los casos de linfoma intestinal.

6.4.1 PARÁMETROS DE LA WSAVA

La utilización de estos parámetros no ha resultado fácil ya que, a pesar de ser lo más estrictos posible en cuanto a los límites de cada categoría, y a que estos estándares incluyen fotografías y descripciones precisas, muchas veces queda todavía un espacio para la subjetividad, que dificulta la estandarización de criterios.

Todos los perros de este estudio presentan alteraciones importantes en los parámetros de la WSAVA, entre ellas un infiltrado linfoplasmocitario de moderado a intenso en todos los casos, lo cual era previsible dado que se han elegido por el carácter grave de las lesiones. Encontramos diferencias entre grupos en la gravedad de los parámetros, más que en su aparición o no. Este es el caso del **acortamiento-ensanchamiento de las vellosidades intestinales**, que está presente en casi todos los casos, lo que era de esperar, ya que se ha descrito muy frecuentemente tanto en el linfoma intestinal (Valli y col., 2007) como en el IBD (Willard y col., 2010; Olivero y col., 2011). Sin embargo, es interesante que aparezca en grado intenso de manera significativamente más frecuente en el grupo Linfoma. Lo mismo ocurre con la **lesión epitelial**, que es, también, significativamente más intensa en el caso del linfoma intestinal. También es más intensa en el grupo Linfoma la presencia de **neutrófilos**, lo que consideramos coherente, ya que suelen acompañar a la lesión epitelial. La presencia de neutrófilos no se considera, de manera general, un hallazgo frecuente en la enteritis crónica linfoplasmocitaria (Tams, 2003), aunque hay un estudio que la describe hasta en un 30% de las biopsias (Jacobs y col., 1990). En el presente estudio, la existencia de neutrófilos en el grupo IBD alcanza porcentajes mayores, lo que creemos que es debido al carácter grave de nuestros casos, siendo la presencia de estas células inflamatorias un posible reflejo de una respuesta inflamatoria dirigida a algún componente microbiano,

que esté participando de una u otra manera en la enfermedad. En ninguno de los casos del grupo Linfoma encontramos, sin embargo, presencia de **eosinófilos**, algo que ocurre en un porcentaje bajo de casos de los grupos IBD y DLP, quizá relacionado con un posible componente alérgico o parasitario. Sin embargo, que existan eosinófilos en casos de linfoma intestinal canino está también descrito en la bibliografía (Ozaki y col., 2006; Valli, 2007).

Consideramos que es difícil comparar estos parámetros entre grupos, pero podemos afirmar que en todos los casos del grupo Linfoma coexiste una enteritis crónica, y que en muchos casos presentan cambios inflamatorios más graves que los casos del grupo IBD, especialmente y de forma significativa para los parámetros acortamiento-ensanchamiento de vellosidades, lesión epitelial y linfocitos intraepiteliales. En cuanto a los parámetros fibrosis, dilatación de criptas y dilataciones linfáticas (linfangiectasias intestinales), son más frecuentes en el grupo Linfoma, pero las diferencias entre grupos son pequeñas y no significativas en este trabajo.

La presencia de **linfangiectasias** se considera habitual en grado moderado en el IBD canino (Brown y col., 2007), describiéndose en casi la totalidad de animales en varios trabajos (Rodríguez-Franco y col., 2002; Olivero y col., 2011). Creemos que en este trabajo la prevalencia de linfangiectasias es algo menor en el grupo IBD debido a la utilización de los parámetros estandarizados de la WSAVA. Es posible que, en trabajos anteriores, se considerasen como linfangiectasias dilataciones del vaso linfático central de las vellosidades intestinales que no alcanzaban el 50% de la anchura de la vellosidad, que es el mínimo considerado por la WSAVA para constatar la presencia de linfangiectasias intestinales (Day y col., 2008). En los casos del presente estudio, la presencia de dilataciones de vasos linfáticos se considera un proceso secundario, a diferencia de la linfangiectasia primaria, que tiene entidad propia como enfermedad. El origen de las linfangiectasias en nuestros pacientes podría ser potencialmente debido a una extensión del proceso inflamatorio, que llega a alcanzar la red linfática intestinal, dificultando así la adecuada circulación linfática en ese tramo. Además, puede dar lugar a la alteración de la permeabilidad de estos vasos, debido a la acción de citoquinas (Tams, 2003).

La **fibrosis**, que afecta a la mitad de los perros del grupo IBD, y es algo superior en el grupo linfoma, puede ser una consecuencia de la presencia de edema, de una inflamación intensa, y de pequeños focos de necrosis, que son capaces de inducir fibroplasia, con la aparición de tejido conjuntivo en

determinadas zonas de la mucosa intestinal (Wilcock y col., 1992). Consideramos que la fibrosis en nuestros casos puede estar infravalorada, y por ello no corresponderse con los casos de mucosa dura a la toma de biopsias endoscópicas. Creemos que sería de gran utilidad para futuros trabajos la utilización de métodos más objetivos, como las técnicas inmunohistoquímicas para detectar colágeno tipo I.

La **dilatación de criptas**, presente en el 65-75% de los casos de los grupos Linfoma e IBD se produce debido a procesos de hiperplasia del epitelio, y a la liberación de mediadores químicos debido al proceso inflamatorio, que impiden la eliminación de detritus a la superficie de la mucosa, y también al acúmulo de moco por el aumento del número y de la secreción de las células caliciformes. Hay autores que han demandado la ausencia, en los estándares de la WSAVA, de alusión a las células caliciformes (Simpson y col., 2011); sin embargo, este parámetro sería de importancia fundamentalmente en los casos de colitis crónicas, más que en los de duodenitis.

El parámetro más interesante de los estudiados es la presencia de **linfocitos intraepiteliales**, más común en el grupo Linfoma, tratándose, además, de un infiltrado más intenso. El epiteliotropismo se ha descrito como un rasgo importante a la hora de emitir una sospecha de linfoma en casos que pueden aparentar tratarse de una enfermedad inflamatoria crónica intestinal (Valli, 2007). Un trabajo que valora los linfocitos intraepiteliales en casos de IBD según los criterios de la WSAVA encuentra que la gran mayoría de los pacientes los presentan en grado leve o moderado, y tan sólo un 5% en grado grave (Olivero y col., 2011). En la especie felina, algunos artículos recientes otorgan una importancia muy significativa a este parámetro en la diferenciación entre IBD y linfoma intestinal en biopsias endoscópicas (Kiupel y col., 2011; Briscoe y col., 2011; Moore y col., 2012). Estos trabajos estudian más en profundidad la distribución, la gravedad, y el patrón de los linfocitos intraepiteliales, utilizando técnicas inmunohistoquímicas, como se ha hecho en este trabajo y se comentará más adelante, en el apartado de inmunohistoquímica.

En el grupo DLP encontramos una frecuencia e intensidad intermedia respecto a los grupos Linfoma e IBD para los parámetros acortamiento-ensanchamiento de vellosidades, lesión epitelial y linfocitos intraepiteliales. Estos datos no nos aportan mucha información, pero sí reiteran que se trata de casos muy graves, casi intermedios entre ambas enfermedades, que requieren estudios en profundidad para poder categorizarlos.

No hay muchos estudios sobre el linfoma digestivo canino, y los pocos que hay se refieren más a la clínica, no incluyen descripciones muy minuciosas de parámetros histopatológicos, y no comparan con la enfermedad inflamatoria crónica intestinal (Coyle y col., 2004; Ozaki y col., 2006; Frank y col., 2007; Rassnick y col., 2009). Por ello creemos que resulta interesante comparar estos resultados con estudios similares en la especie felina, en la que está más estudiada la diferenciación entre linfoma intestinal e IBD, con varios estudios muy recientes. Briscoe y colaboradores (2011) estudian algunos de los parámetros que aquí exponemos en dos grupos de animales, gatos diagnosticados de IBD y gatos diagnosticados de linfoma, de manera que las diferencias entre los dos grupos resultan significativas para el epiteliotropismo y para el acortamiento-estrechamiento de vellosidades intestinales, y no lo son para las dilataciones linfáticas y la presencia de fibrosis, ni tampoco para la presencia de infiltrados de neutrófilos o eosinófilos, lo que coincide plenamente con lo obtenido en el presente trabajo para la especie canina. Sin embargo, en dicho estudio también existen diferencias significativas entre los dos grupos en la presencia de dilatación de las criptas, lo que no ocurre en el presente estudio. Además no valoran la existencia de lesión epitelial, que es significativa en este estudio. Debemos tener en cuenta que en el estudio de Briscoe y colaboradores incluyen un 80% de casos dentro del grupo IBD en los que sólo hay un infiltrado linfoplasmocitario de carácter leve. Es posible que al incluir solamente casos de IBD grave entre nuestros casos de IBD, sea más frecuente encontrar cambios en la arquitectura de las criptas, de manera que las diferencias con el grupo Linfoma no llegan a ser significativas.

Hemos calculado el **índice de gravedad de la lesión inflamatoria duodenal a nivel histopatológico**, caracterizado por la suma de los valores de los parámetros de la WSAVA, de manera que este índice ha sido significativamente superior en el grupo Linfoma que en los otros dos grupos. Este nos parece un hallazgo muy interesante, que indica la gravedad de los cambios inflamatorios en los casos de linfoma intestinal, lo que justifica, en parte, la dificultad en su diferenciación. Además, otro hecho destacable, es que el grupo Linfoma incluye casos que en su mayoría han podido diagnosticarse observando las preparaciones con tinciones habituales, debido a cambios en la arquitectura y la morfología de las células, que pueden reflejarse en el índice de gravedad de los cambios inflamatorios. Sin embargo, encontramos la mayor dificultad de este estudio en el diagnóstico de los casos del grupo DLP. El índice calculado para este grupo es prácticamente igual al del grupo IBD. Quizá en este grupo deberíamos atender al cálculo del índice individuo a individuo, de manera

que sólo dos de los casos de este grupo presentan un índice de 10 puntos o más, lo que podría suponer inicialmente una sospecha para su inclusión en el grupo Linfoma, sin embargo, varios casos del grupo IBD presentan índices superiores a 10, de manera que los resultados se superponen y no nos permiten extraer conclusiones. Observamos que las puntuaciones que hemos obtenido en el índice de la WSAVA son más bajas de lo que cabría esperar en casos graves, como los tratados en este estudio. Como había ocurrido con esquemas anteriores creemos que es difícil establecer estándares basados en fotografías que supongan un criterio común para el acuerdo entre patólogos a nivel internacional, y en los que no intervenga una interpretación subjetiva. Además, este esquema otorga la misma puntuación a todos los parámetros, y el simple sumatorio de ellos podría estar subestimando la gravedad del proceso. En esto coincidimos con estudios recientes (Willard y col., 2010; Simpson y col., 2011)

6.4.1.1. RELACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA WSAVA CON LOS HALLAZGOS CLÍNICOS Y ENDOSCÓPICOS

En este trabajo se han encontrado relaciones entre el índice de gravedad de la lesión inflamatoria duodenal a nivel histopatológico y la presencia de alteraciones del apetito moderadas o graves. La mayoría de estudios han fracasado en alguna correlación entre los hallazgos histopatológicos y los signos clínicos, la respuesta al tratamiento o el pronóstico en el IBD canino (Craven y col., 2004; Allenspach y col., 2007; McCann y col., 2007; Schreinerr y col., 2008; Willard y col., 2010). En cuanto al linfoma intestinal, no se han encontrado referencias a la relación entre la sintomatología y la histopatología en los estudios consultados.

La presencia de linfangiectasias o de lesiones graves en las criptas se ha asociado a la enteropatía con pérdida de proteínas en el IBD (Willard y col., 2000; Willard y col., 2010), aunque no se han encontrado referencias a esta asociación para el linfoma intestinal. En el presente trabajo no se han encontrado asociaciones significativas entre los parámetros histopatológicos mencionados y la presencia de hipoproteinemia.

En cuanto a la relación de la histopatología con los hallazgos ecográficos, se han encontrado asociaciones significativas entre la lesión epitelial y, tanto el engrosamiento de la pared intestinal como la pérdida de diferenciación de capas,

y entre el acortamiento-ensanchamiento de vellosidades intestinales y la pérdida de diferenciación de capas. Creemos que este hecho puede explicarse debido a que todos los parámetros asociados son significativamente más frecuentes en el grupo Linfoma de los perros de este estudio, lo que puede justificar la asociación entre ellos. No se han encontrado referencias de este tipo en la bibliografía consultada.

La mayoría de la bibliografía consultada coincide en la ausencia de correlación entre las lesiones macroscópicas observadas por endoscopia y las lesiones histopatológicas en el duodeno de los perros con IBD o linfoma intestinal, aunque los estudios en linfoma intestinal son escasos (Roth y col., 1990; Jergens y col., 1992; Rodríguez-Franco y col., 1999; Hall y col., 2007). A pesar de que la valoración macroscópica del estado de la mucosa es subjetiva, un estudio describe una estrecha asociación entre la evidencia endoscópica de un incremento en la friabilidad y la irregularidad de la mucosa, y un incremento de la celularidad en la lámina propia (Roth y col., 1990). En nuestro caso todos los animales estudiados presentaban una celularidad de moderada a intensa en la lámina propia. Sólo se ha encontrado relación de algunos parámetros histopatológicos (lesión epitelial e infiltrado intenso de neutrófilos) con la presencia de una mucosa dura a la toma de biopsias durante la endoscopia. Como hemos comentado, no se han encontrado referencias en la bibliografía referentes a este parámetro endoscópico. Consideramos que esta asociación se produce porque todos los parámetros implicados son significativamente más frecuentes en el grupo Linfoma que en el grupo IBD. También se ha encontrado una asociación positiva significativa entre el índice de gravedad de la lesión inflamatoria duodenal a nivel histopatológico y el parámetro endoscópico mucosa dura a la toma de biopsias, lo que puede deberse a que ambos factores son significativamente más frecuentes en el grupo Linfoma.

6.4.2. OTROS PARÁMETROS NO WSAVA EVALUABLES EN TODOS LOS CASOS

Existen numerosos parámetros histopatológicos, además de los publicados por la WSAVA (Day y col., 2008), que han sido evaluados en diferentes trabajos en las enfermedades objeto de este estudio. Entre los parámetros estudiados, no hemos incluido la presencia de edema, que ha sido descrito en otros trabajos (Wilcock y col., 1992; Yamashaki y col., 1996;

Rodríguez-Franco y col., 2002; Briscoe y col., 2011), ya que lo consideramos un artefacto frecuente, debido a factores externos relacionados con el procesamiento de las biopsias, haciendo muy difícil su diferenciación de un edema realmente inflamatorio. Creemos que es probable que estas sean las razones por las que Day y colaboradores no han incluido este parámetro entre la serie de parámetros estandarizados para la clasificación de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal que proponen (Day y col., 2008). Nos ha parecido interesante realizar un estudio más detallado de los patrones del infiltrado de células redondas en la lámina propia, así como de su distribución, como han sugerido recientemente Moore y colaboradores en su estudio sobre linfoma intestinal en la especie felina (Moore y col., 2012). De esta forma se pueden establecer posibles diferencias entre los casos del grupo IBD y del grupo Linfoma, al mismo tiempo que permite la caracterización de ambas enfermedades.

Lo más frecuente entre los casos de este estudio, en todos los grupos, es encontrar un **infiltrado linfoplasmocitario de carácter difuso** y de **alta densidad**, lo que se considera, a grandes rasgos, lo más común tanto en el IBD grave como en el linfoma intestinal difuso (Tams, 2003; Ozaki y col., 2006). Sin embargo, encontramos un infiltrado de carácter focal o multifocal en el 37,5% de los casos del grupo Linfoma, siempre con un infiltrado inflamatorio concomitante de tipo difuso. Una vez más debemos acudir a las referencias bibliográficas que encontramos en la especie felina para poder establecer comparaciones, ya que la mayoría de estudios en el perro se refieren a casos de linfoma en forma de masa obtenidos en cirugía o necropsia, que se ajustan menos a las características de nuestra población. Moore y colaboradores, en un trabajo reciente, estudian en profundidad el infiltrado de los linfomas intestinales felinos, describiendo diferentes patrones, algunos de manera focal o parcheada, definiendo en los casos más leves un infiltrado de la lámina propia de las vellosidades, en los que incluso aparecían vellosidades en las que no se observaba proceso neoplásico, combinadas con otras en las que sí (Moore y col., 2012). Esto es precisamente lo que ocurre, además de en el grupo Linfoma, en algunos de los casos del grupo DLP de este estudio, en los que aparecen vellosidades con un infiltrado sugerente de linfoma intestinal cerca de otras en las que encontramos un proceso inflamatorio únicamente. Esto ha sido mencionado en la entidad descrita por Valli, el linfoma T tipo enteropatía, en casos de linfoma incipiente (Valli, 2007).

Además, entre los casos del grupo Linfoma de este estudio, encontramos en más de la mitad de los casos una **obliteración de la lámina propia**, mientras

que en el resto de casos esta obliteración afecta sólo a la lámina propia de las vellosidades intestinales. En uno de los casos del grupo Linfoma hallamos, al mismo tiempo, un infiltrado en forma de banda, que coincide con lo descrito por Moore y colaboradores (Moore y col., 2012). Kiupel y colaboradores describen incluso la afectación de una sola vellosidad intestinal tanto en el linfoma intestinal como en el IBD en la especie felina, aunque era poco frecuente en ambas enfermedades (Kiupel y col., 2011). En el presente trabajo en sólo uno de los casos del grupo IBD se considera que el infiltrado se distribuye de forma parcheada, siendo difuso en el resto de los casos. A la luz de nuestros resultados parece que el patrón del infiltrado en los casos de linfoma intestinal canino difiere poco con lo publicado en la especie felina, al menos a nivel de la mucosa intestinal, que es la porción que podemos evaluar con biopsias endoscópicas.

En este apartado incluíamos la evaluación del epiteliotropismo de las lesiones intestinales, sin embargo, al haberse evaluado con las técnicas inmunohistoquímicas, se comentará más adelante.

6.4.3 PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL LINFOMA INTESTINAL

Entre los parámetros histopatológicos que estudios recientes mencionan como significativamente diferentes entre linfoma intestinal e IBD en la especie felina nos encontramos con la infiltración de capas por debajo de la mucosa (submucosa, túnica muscular, y serosa); aunque también un escaso número de casos de IBD presentan una infiltración linfocítica por debajo de la mucosa, y numerosos linfomas se limitan a la capa mucosa (Briscoe y col., 2011; Kiupel y col., 2011), e incluso predominan (Moore y col., 2012). La infiltración de capas profundas se ha descrito de manera frecuente en los casos de linfoma gastrointestinal canino (Tams, 2003; Ozaki y col., 2006). Sin embargo, este es un parámetro imposible de valorar en biopsias endoscópicas, lo que probablemente sea una de las mayores limitaciones de esta técnica.

Hemos valorado otro parámetro estrechamente ligado a cambios neoplásicos, la **pérdida de estructura de la pared intestinal**. Ha resultado significativamente más frecuente entre los casos del grupo Linfoma (62,5%), ya que sólo uno de los casos del grupo IBD presenta una pérdida de arquitectura muy ligera. Ninguno de los casos del grupo DLP presenta pérdida de arquitectura de la pared intestinal. Esto se debe a que se trata de un parámetro

que casi supone, junto con la morfología del infiltrado, un diagnóstico directo de linfoma intestinal, y son los casos en los que resulta de verdad difícil el diagnóstico diferencial IBD/linfoma intestinal los que se han seleccionado para formar parte del grupo DLP. Este parámetro se ha asociado significativamente con el índice de gravedad de la lesión inflamatoria duodenal a nivel histopatológico, lo que pensamos se debe a que ambos son significativamente más frecuentes (o, en el caso del índice de gravedad, más alto) en el grupo Linfoma.

Entre los casos de este estudio, se ha considerado que el **infiltrado** es de **tipo monomórfico** en todos los del grupo Linfoma, mientras que ha resultado polimórfico en todos los casos de IBD. Sin embargo, los resultados variables aparecen en el grupo DLP, en el que encontramos focos que se consideran monomórficos en el 77,8% de los casos, pese a existir un infiltrado polimórfico concomitante. Este parámetro lo evalúan Kiupel y colaboradores en su trabajo sobre el linfoma intestinal y el IBD felino. En este caso consideran que tres casos de IBD presentan un infiltrado monomórfico (representan el 6% de los casos con un infiltrado monomórfico), y 4 linfomas presentan un infiltrado polimórfico (representan el 30,8% de los casos con un infiltrado polimórfico. Kiupel y col., 2011). Estos resultados ponen de manifiesto la dificultad en el diagnóstico de los casos del grupo DLP del presente estudio, ya que algunos de ellos pueden representar los escasos casos de IBD con infiltrado monomórfico, o bien de linfoma con infiltrado polimórfico. El carácter monomórfico del infiltrado linfocitario se ha asociado significativamente al grado intenso de los parámetros histopatológicos de la WSAVA acortamiento-ensanchamiento de vellosidades y lesión epitelial. En este caso, existe un elevado número de casos dentro del grupo DLP que presentan un infiltrado de carácter monomórfico, que se asocia significativamente a los dos parámetros de la WSAVA que son significativamente más frecuentes en el grupo Linfoma. Quizá este hallazgo podría significar que, en los casos del grupo DLP en los que existe un infiltrado monomórfico y además un acortamiento-ensanchamiento de vellosidades de grado intenso junto con una lesión epitelial de grado intenso, la sospecha de linfoma sea mayor que en el resto de casos de este grupo.

6.4.4 MORFOLOGÍA E ÍNDICE MITÓTICO DE LOS LINFOMAS INTESTINALES

En este apartado vamos a hablar de los casos diagnosticados de linfoma intestinal canino (grupo Linfoma). La mayoría de ellos se han considerado de células grandes (75%), lo que se acerca a lo más frecuentemente descrito en el linfoma T asociado a enteropatía en medicina humana, en el que los linfomas de células grandes constituyen el 80-90% de ellos (Riddell y col., 2003; Burke y col., 2011). En el único trabajo en medicina veterinaria que menciona este nuevo tipo de linfoma intestinal descrito por la OMS, en la especie felina, tan solo el 14,6% de los casos resultaron ser de células grandes (Moore y col., 2012). Ozaki y colaboradores, en su estudio sobre el linfoma intestinal de tipo T canino, describen tres casos de células pequeñas, cuatro de células de tamaño moderado y cuatro de células grandes (Ozaki y col., 2006). Queremos resaltar que los casos incluidos en el grupo Linfoma corresponden a casos en los que el diagnóstico de las biopsias intestinales era claramente un linfoma. Sin embargo, en el grupo DLP nos encontramos poblaciones monomorfas de linfocitos de tamaño pequeño-intermedio, que generan una sospecha de linfoma. Por ello, nuestra población del grupo Linfoma puede encontrarse sesgada, y que los casos de células pequeñas-medianas estén incluidos en el grupo DLP. Como se ha comentado a lo largo de este trabajo, se conoce muy poco sobre el comportamiento de los linfomas intestinales en el perro. Valli sugiere que puede ser que los cambios neoplásicos estén presentes sólo en células aisladas, y que la imagen general sea la de una lesión benigna, como la de una enteritis crónica linfoplasmocitaria de tipo epiteliotrópico. En estos estadios, la transición hacia neoplasia es muy sutil, y su detección resulta de extrema dificultad para patólogos experimentados (Valli, 2007). En el linfoma intestinal asociado a enteropatía de medicina humana también se describe que el infiltrado inflamatorio concomitante puede ser tan abundante que llegue a dificultar la detección de pequeñas poblaciones de células tumorales (Swerdlow y col., 2008; Burke y col., 2011). Creemos que esto es lo que puede estar sucediendo en los casos del grupo DLP.

La morfología de los dos casos de células pequeñas ha sido la de unos linfocitos de núcleo picnótico, ausencia de nucleolos evidentes, cromatina muy condensada y casi ausencia de citoplasma. Sin embargo, entre los linfomas de células grandes, tres de los casos presentan ausencia de nucleolos evidentes y cromatina pulverulenta, citoplasma claro y lateral. Los otros tres casos de células

grandes presentan una predominancia de células con nucleolos evidentes y en algunos casos múltiples, citoplasma casi inexistente, cromatina difusa y de aspecto granular, coincidiendo este último con el patrón descrito con Valli (2007) para el linfoma T tipo enteropatía. Tradicionalmente esta morfología se asociaba a linfomas de tipo B. En ninguno de los casos de este estudio se han encontrado gránulos eosinófilos en el citoplasma de los linfocitos neoplásicos (Head y col., 2003), hecho descrito por Moore y colaboradores en la especie felina (Moore y col., 2012). En todos los casos hay también linfocitos pequeños y picnóticos, que se han considerado linfocitos no neoplásicos, correspondientes al proceso inflamatorio asociado presente en todas las muestras (Valli, 2007). En la mayoría de los casos se han encontrado vellosidades de aspecto normal adyacentes a las vellosidades de aspecto neoplásico, dato que ya ha sido descrito por otros autores (Valli, 2007). Son escasos los trabajos que detallan la morfología de linfomas intestinales caninos, con descripciones variables, y casos que se alejan de los casos de este estudio (Coyle y col., 2004; Ozaki y col., 2006)

El pleomorfismo celular se considera raro en el linfoma intestinal asociado a enteropatía en la especie humana (Swerdlow y col., 2008; Burke y col., 2011). En la especie canina, Ozaki y colaboradores describen la presencia de pleomorfismo en el 36,4% de los casos de linfoma T intestinal que estudian, todos ellos de células grandes (Ozaki y col., 2006). En nuestro estudio el porcentaje de pleomorfismo es superior, del 62,5%, también todos de células grandes, como en el estudio de Ozaki y colaboradores. Creemos que el porcentaje puede ser mayor en el presente estudio que en el de Ozaki y colaboradores debido a que encontramos un mayor porcentaje de linfomas de células grandes que ellos, ya que suponemos que algunos de los casos de células pequeñas han podido quedar incluidos en el grupo DLP. En el estudio de Ozaki y colaboradores utilizan biopsias obtenidas mediante cirugía, lo que puede suponer un diagnóstico de un mayor número de linfomas, que en el presente estudio de biopsias endoscópicas hayamos incluido en el grupo DLP. Además, la mayoría de los casos del estudio de Ozaki y colaboradores son linfomas en forma de masa, mientras que todos los casos de nuestro estudio son linfomas difusos, que podrían presentar un comportamiento diferente (Ozaki y col., 2006).

La presencia de mitosis se considera rara en el linfoma T tipo enteropatía en medicina veterinaria (Valli, 2007). Ozaki y colaboradores describen un índice mitótico de 14 por diez campos de 40x en los linfomas T-intestinales que estudian. Esta cifra es similar a la que encontramos en los casos de linfoma de células grandes del presente estudio (13,8), pero sin embargo, ha sido más bajo

para los casos de linfoma de células pequeñas (7,5). Otro estudio en el linfoma gastrointestinal canino encuentra cifras de mitosis mayores que en el presente estudio, de hasta 3-4 mitosis por campo de grandes aumentos en los linfomas con epiteliotropismo (Coyle y col., 2004). Debemos tener en cuenta que este estudio incluye también casos localizados en estómago o intestino grueso, tanto de biopsias como de necropsias, lo que hace difícil la comparación de resultados. También hemos de considerar que, entre los casos del grupo DLP de este estudio, no hemos encontrado presencia significativa de mitosis, pese a que corresponden a potenciales casos de linfoma intestinal.

Parece que el índice mitótico puede estar relacionado con la gravedad endoscópica e histológica de los casos de linfoma, ya que ha presentado una correlación significativa y alta con el índice de alteración endoscópica y con el índice de gravedad de la lesión inflamatoria duodenal a nivel histopatológico. La presencia de células en división, estudiada frecuentemente por la expresión del índice de proliferación celular Ki-67, se ha relacionado en varios trabajos con linfomas de alto grado y con un peor pronóstico en el linfoma multicéntrico en la especie canina (Fournel-Fleury y col., 1997; Phillips y col., 2000). Sin embargo, no hemos encontrado ninguna referencia a la relación entre el índice mitótico o la expresión de Ki-67 con la malignidad o el pronóstico de los linfomas gastrointestinales caninos.

6.5 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

6.5.1. EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES LINFOCITARIOS CD3 Y CD20

6.5.1.1. CLASIFICACIÓN DE LAS LESIONES UTILIZANDO CD3 Y CD20

Varios trabajos ponen de manifiesto las dificultades que existen en el diagnóstico histopatológico de linfoma intestinal en biopsias endoscópicas (Valli, 2007; Fukushima y col., 2009; Washabau y col., 2010; Gieger, 2011). En la especie felina existen numerosos trabajos al respecto (Krecic y col., 2001; Briscoe y col., 2011; Barrs y col., 2012), y varias veces se han publicado casos de diagnósticos histopatológicos erróneos en biopsias endoscópicas, que posteriormente recibieron otro diagnóstico, bien con biopsias quirúrgicas (Evans y col., 2006), bien con técnicas inmunohistoquímicas o de PCR (Waly y col., 2005; Kiupel y col., 2011), o tras observar la respuesta al tratamiento (Wasmer y col., 1995). Esto también ha ocurrido en alguna ocasión con biopsias obtenidas por laparotomía exploratoria o de necropsias (Ragaini y col., 2003; Waly y col., 2005). Consideramos que el problema no se limita a las biopsias endoscópicas, pero sí se agrava en el caso de éstas.

En el presente estudio se han realizado técnicas inmunohistoquímicas para la detección de los marcadores linfocitarios CD3 y CD20, que se han utilizado como complemento al diagnóstico histopatológico de los casos de este estudio. Estos marcadores se habían utilizado para el inmunofenotipaje del linfoma gastrointestinal canino en un trabajo (Coyle y col., 2004). Otros estudios utilizan CD3 y CD79a (marcador de linfocitos B, al igual que CD20), para linfomas caninos de distintas localizaciones (Milner y col., 1996; Sueiro y col., 2004; Sokolowska y col., 2005; Keller y col., 2007; Lurie y col., 2008; Vezzali y col., 2010; Valli y col., 2011; Ponce y col., 2010). En el presente estudio se ha elegido CD20 en lugar de CD79, ya que en pruebas preliminares presentaba una mejor inmunotinción en las muestras del estudio.

Tras observar las muestras de este estudio con las técnicas inmunohistoquímicas para CD3 y CD20, se produce un cambio en el diagnóstico

de varios casos y con ello, de grupo de estudio, constituyéndose los grupos definitivos que se han utilizado a lo largo del trabajo (tabla 22 en resultados). En la especie felina, encontramos un estudio parecido y, dada la ausencia de datos concretos en la especie canina, hemos considerado interesante su comparación con nuestros resultados (Kiupel y col., 2011). En dicho estudio, tras evaluar las muestras teñidas con técnicas inmunohistoquímicas para CD3 y CD79, tres casos que habían sido diagnosticados de IBD pasan a diagnosticarse de linfoma T, mientras que un caso diagnosticado de linfoma T pasa a ser diagnosticado de IBD, de un total de 56 casos de IBD o linfoma T (en el estudio había otros casos, diagnosticados de linfoma B; Kiupel y col., 2011). En el presente trabajo, sin embargo, nos es posible concretar el diagnóstico de seis de los casos que originariamente consideramos en el grupo DLP, pasando cinco de ellos al grupo IBD, y uno de ellos al grupo Linfoma. Además, dos de nuestros casos diagnosticados inicialmente de IBD pasan al grupo DLP. Es probable que, si en el trabajo de Kiupel y colaboradores se hubiese establecido un grupo inicial DLP al observar las muestras con las tinciones habituales, los casos que fueron nuevamente diagnosticados habrían pertenecido a ese grupo. Es posible que en nuestro trabajo ocurra esto en un número más elevado de casos que en el trabajo de Kiupel y colaboradores debido a que todos los casos del grupo IBD han sido elegidos por ser IBD grave y los del grupo DLP por su dificultad en el diagnóstico, excluyendo del estudio casos de IBD leve o moderado en los que el diagnóstico con hematoxilina-eosina sería, probablemente, concluyente. En el presente estudio, todos los casos diagnosticados con H-E de linfoma siguen en este grupo tras la observación de las muestras teñidas con los marcadores linfocitarios.

Este trabajo demuestra que un número significativo de linfomas T intestinales pueden ser incorrectamente diagnosticados de inflamación utilizando únicamente histopatología. La utilización de técnicas inmunohistoquímicas resulta útil para eliminar las dudas diagnósticas en algunos casos, o bien para crear sospecha de linfoma en otros.

Además, queremos destacar que este trabajo muestra los buenos resultados que ofrece la utilización del marcador CD20 en lugar de CD79, como sugerían Coyle y colaboradores (Coyle y col., 2004). En pruebas preliminares se utilizó el marcador CD79, encontrando una mejor inmunorreacción con el marcador CD20 que es, por ello, el que se ha empleado en este trabajo. En la mayoría de publicaciones sobre el linfoma canino, es CD79 es el marcador utilizado (Milner y col., 1996; Sueiro y col., 2004; Sokolowska y col., 2005; Keller

y col., 2007; Lurie y col., 2008; Vezzali y col., 2010; Valli y col., 2011; Ponce y col., 2010).

6.5.1.2. INMUNOFENOTIPO DE LAS LESIONES

Hasta la fecha, la mayoría de autores coinciden en que los linfomas gastrointestinales caninos son más frecuentes de inmunofenotipo T que de inmunofenotipo B (Miura y col., 2004; Coyle y col., 2004; Ozaki y col., 2006; Frank y col., 2007; Rassnick y col., 2009), al contrario de lo que ocurre en el linfoma multicéntrico canino (Teske y col., 1994; Ruslander y col., 1997; Fournel-Fleury y col., 2002; Sueiro y col., 2004; Sokolowska y col., 2005; Sözmen y col., 2005; Guija de Arespacochaga y col., 2007; Keller y col., 2007; Gavazza y col., 2008; Vezzali y col., 2009; Ponce y col., 2010). Al igual que en el perro, en la especie felina son también más frecuentes los linfomas gastrointestinales de tipo T en la mayoría de estudios (Zwahlen y col., 1998; Cesari y col., 2009; Briscoe y col., 2011; Kiupel y col., 2011; Moore y col., 2012). Sin embargo, curiosamente, los linfomas gastrointestinales en medicina humana son en su mayoría de inmunofenotipo B (Kohno y col., 2003; Yang y col., 2004; Radic-Kristo y col., 2010; Arora y col., 2011; Kim y col., 2011).

En el presente estudio, el 100% de los linfomas intestinales caninos estudiados son de inmunofenotipo T, coincidiendo con el estudio de Miura y colaboradores (2004). Sin embargo, este porcentaje es superior al de otros estudios, que publican porcentajes entre el 63 y el 75% (Coyle y col., 2004; Frank y col., 2007; Rassnick y col., 2009). Estos últimos trabajos incluyen linfomas de diferentes localizaciones del tracto gastrointestinal, por lo que es posible que el linfoma de tipo T sea más prevalente en las primeras porciones del intestino delgado que en otras localizaciones del tracto gastrointestinal, como el estómago, al igual que ocurre en medicina humana (Swerdlow y col., 2008). Recientemente un estudio de diez casos de linfoma intestinal canino localizado en el recto verifica que se trata en todos los casos de linfoma de tipo B (Van den Steen y col., 2012).

Moore y colaboradores, estudian 120 casos de linfoma gastrointestinal en la especie felina, entre los que predominan los linfomas de inmunofenotipo T. En este trabajo, pese a que hay 19 casos de linfoma de inmunofenotipo B, tan sólo uno afecta a duodeno, que además es una extensión de un linfoma de antro pilórico (Moore y col., 2012), lo que concuerda con nuestros resultados. Pohlman

y colaboradores, en su estudio sobre el linfoma gastrointestinal felino, describen que todos los casos localizados en el estómago son de inmunofenotipo B, al igual que el 88% de los casos de intestino grueso (Pohlman y col., 2009). En la especie felina, un estudio que compara el linfoma intestinal de bajo grado y la enteritis linfoplasmocitaria, describe 27 de 28 casos de linfoma de inmunofenotipo T (Briscoe y col., 2011). Además, a la vista de nuestros resultados, es posible que los linfomas difusos, estudiados en el presente trabajo, sean más frecuentemente de inmunofenotipo T que los que aparecen en forma de masa en la especie canina.

Nuestros resultados sugieren que, en la especie canina, el linfoma intestinal que afecta a duodeno y primeras porciones de yeyuno de forma difusa es mucho más frecuente de inmunofenotipo T que de inmunofenotipo B. No existen estudios publicados al respecto, y sería necesaria la realización de estudios con un mayor número de casos para confirmar esta sospecha. Es posible que esto ocurra en los casos que además de ser difusos se acompañan de un infiltrado inflamatorio crónico. Por ello, basándonos en las características descritas previamente, y según la última clasificación de la OMS para los linfomas en medicina humana (Swerdlow y col., 2008), podemos considerar que nuestros casos se corresponden a linfomas T asociados a enteropatía (EATL). Concretamente, los linfomas T de células pequeñas de este estudio parecen corresponder con el linfoma T asociado a enteropatía (EATL) de tipo II, mientras que los de células grandes parecen corresponder con el EATL de tipo I. Nuestro trabajo confirma que el linfoma T-intestinal (actualmente linfoma T tipo enteropatía o asociado a enteropatía) puede presentar tanto células grandes como células pequeñas, como ocurre en las clasificaciones de la OMS para medicina humana (Swerdlow y col., 2008). Este hecho rompe con la creencia tradicional de algunos patólogos, avalada por algunas clasificaciones de la OMS para medicina veterinaria (Head y col., 2003), de que los linfomas de células grandes eran de inmunofenotipo B.

Con respecto a la enfermedad inflamatoria crónica intestinal, ésta se caracteriza por un infiltrado de linfocitos y células plasmáticas, que ha de presentar tanto células positivas a CD3 como a CD20, lo que se considera un inmunofenotipo mixto (Washabau y col., 2010). Esto ocurre en todos los casos del grupo IBD del presente estudio. En el grupo DLP, sin embargo, un 55,6% de los casos presentan una zona CD3 positiva, que se considera sospechosa de linfoma, pese a que pueda existir una expresión mixta de ambos marcadores en el resto del tejido. En algunos de los casos, los linfocitos sospechosos eran

simplemente los linfocitos intraepiteliales, que invadían grandes porciones de epitelio, todos ellos de inmunofenotipo T. Valli describe que el cambio neoplásico en un estado inicial de linfoma intestinal puede estar presente sólo en células aisladas, con una imagen general de la muestra de IBD (Valli, 2007). En medicina humana, se ha descrito la EATL (linfoma T asociado a enteropatía) “in situ” para casos en los que los linfocitos intraepiteliales muestran características de malignidad, pero aún no puede detectarse la presencia de linfoma (Swerdlow y col., 2008; Burke y col., 2011; Busto y col., 2011). En el presente trabajo pensamos que algunos de los casos del grupo DLP pueden encontrarse en esta situación, y por ello, vamos a realizar técnicas de PCR para detectar poblaciones de linfocitos T monoclonales y poder confirmar la presencia de linfocitos neoplásicos.

6.5.1.3. ESTUDIO DE LOS LINFOCITOS INTRAEPITELIALES TEÑIDOS CON CD3

Los linfocitos intraepiteliales se encuentran de forma normal en el epitelio intestinal (German y col., 1999; Sonea y col., 2000); por lo que, en este trabajo, cuando hablamos de epiteliotropismo nos referimos a la presencia de linfocitos intraepiteliales en un número mayor a lo considerado normal (Day y col., 2008).

Como es sabido, los linfocitos intraepiteliales son de inmunofenotipo T tanto en el perro como en el gato (Steinberg y col., 1995; French y col., 1996; Krecic y col., 2000; Carreras y col., 2003; Coyle y col., 2004; Ozaki y col., 2006; Kiupel y col., 2011), lo que coincide con los resultados de nuestro estudio, en el que en todos los casos se tiñen con el marcador CD3. En la especie canina son escasos los estudios en el linfoma intestinal que describen la presencia de linfocitos intraepiteliales y realizan técnicas inmunohistoquímicas. En ellos, se describe la presencia de epiteliotropismo en el 75-100% de los casos de linfoma T gastrointestinal (Coyle y col., 2004; Ozaki y col., 2006), lo que concuerda con nuestros resultados, ya que la totalidad de los casos del grupo Linfoma son de tipo T y presentan epiteliotropismo. Inicialmente se describió el linfoma T epiteliotrópico como una entidad independiente (French y col., 1996; Krecic y col., 2000; Carreras y col., 2003), sin embargo, en las nuevas clasificaciones de la OMS el epiteliotropismo está descrito como un rasgo característico del linfoma T asociado a enteropatía (Riddell y col., 2003; Burke y col., 2011).

Pese a que la WSAVA en sus estándares publica una evaluación de los linfocitos intraepiteliales en las biopsias teñidas con hematoxilina-eosina (Day y col., 2008), queremos destacar la importancia de la evaluación de las muestras teñidas con CD3, ya que potencia enormemente el reconocimiento de los linfocitos intraepiteliales, y facilita su estudio. Esto ha sido sugerido recientemente en estudios sobre el linfoma intestinal en la especie felina (Kiupel y col., 2011; Moore y col., 2012). En el trabajo de Day y colaboradores no proponen estas técnicas, probablemente porque se trata de técnicas más caras a nivel clínico, que se llevan a cabo en casos con sospecha de linfoma intestinal, y no en casos de IBD, que son para los que originariamente están publicados los estándares de la WSAVA. Creemos que se trata de una técnica esencial en los casos en los que pueden existir dudas en el diagnóstico diferencial entre IBD y linfoma intestinal.

La presencia de linfocitos intraepiteliales en la enfermedad inflamatoria crónica intestinal también es relativamente frecuente (Washabau y col., 2010). No se conoce con claridad el papel que desempeñan estas células, aunque es probable que se comporten como “vigilantes” del epitelio, jugando un papel en la defensa frente a organismos patógenos. Incluso se ha propuesto que estas células puedan migrar desde la lámina propia hacia su localización intraepitelial como respuesta a una estimulación antigénica (Hall, 2007). Sin embargo, entre los casos del nuestro estudio, es más frecuente en los casos del grupo Linfoma, que en los del grupo IBD, en los que está presente. En el grupo DLP existe epiteliotropismo en un alto número de pacientes, ya que es precisamente la presencia de un epiteliotropismo muy marcado lo que nos ha hecho incluir varios de los casos en el grupo DLP. En la especie felina, en la que está más estudiado el linfoma intestinal, Briscoe y colaboradores (2011) comparan el epiteliotropismo en linfoma e IBD, utilizando los criterios de Day y colaboradores (2008), describiendo diferencias significativas en este parámetro entre ambas patologías. Describen un porcentaje muy bajo de epiteliotropismo entre los casos de IBD (8,3%), y algo más bajo que el del presente estudio para los casos de linfoma (75,9%; Briscoe y col., 2011). No podemos comparar directamente los resultados de Briscoe y los del presente estudio, ya que se trata de especies diferentes, pero pensamos que el elevado porcentaje de epiteliotropismo entre los casos de los grupos IBD y DLP del presente estudio se debe al carácter grave de estas enfermedades. Kiupel y colaboradores también encuentran diferencias en el epiteliotropismo entre IBD y linfoma en la especie felina, pero estas diferencias van en otro sentido, ya que encuentran un aumento de linfocitos intraepiteliales en 11 de 12 casos de IBD, y en 39 de 43 linfomas T. Según los datos de este

estudio, parece que el epiteliotropismo es muy frecuente tanto en el IBD como en el linfoma T-intestinal, lo que se acerca a los resultados del presente estudio. Sin embargo, consideramos de gran interés estudiar el infiltrado de linfocitos intraepiteliales más a fondo en busca de diferencias entre grupos, como vamos a describir a continuación.

Hemos estudiado la localización de los linfocitos intraepiteliales, encontrando diferencias significativas entre grupos, de manera que lo más frecuente en los grupos IBD y DLP es que el epiteliotropismo se limite al epitelio de revestimiento; pero en el grupo Linfoma el epiteliotropismo se extiende también al epitelio de las criptas en el 62,5% de los casos. Este parámetro ha sido estudiado en un trabajo en la especie felina, encontrándose diferencias entre IBD y linfoma que no llegaban a ser significativas (Kiupel y col., 2011). Según los resultados de nuestro trabajo, parece que la presencia de un infiltrado de linfocitos intraepiteliales de forma difusa a lo largo de la preparación es lo más frecuente en los casos de IBD, sin embargo, en un 25% de los casos del grupo Linfoma afecta de forma notable a una vellosidad o a un grupo de ellas, lo que ha sido descrito en la nueva entidad linfoma T tipo enteropatía en la especie canina (Valli, 2007). Además, el porcentaje de epiteliotropismo en una o varias vellosidades es superior en el grupo DLP, poniendo de manifiesto que se trata de uno de los rasgos que hacen sospechar a los patólogos un diagnóstico de linfoma intestinal.

En el trabajo de Kiupel y colaboradores, en la especie felina, se encuentran diferencias significativas entre IBD y linfoma intestinal en la organización de los linfocitos intraepiteliales en forma de nidos o placas de manera más frecuente en el linfoma, y en forma de células aisladas más frecuente en el IBD (Kiupel y col., 2011). En el presente trabajo, la existencia de placas de linfocitos intraepiteliales es significativamente menos frecuente en el grupo IBD. Sí aparecen linfocitos intraepiteliales en forma de nidos en el 20% de los casos del grupo IBD, lo que consideramos elevado debido a que se trata de casos graves. En el grupo DLP es muy frecuente la presencia de placas (66,7%). Esto es porque se considera uno de los criterios de inclusión de los casos en este grupo. Es posible que estos casos correspondan con casos de linfoma intestinal incipiente. Sin embargo, si se tratase de casos de IBD intenso, podríamos considerar que la presencia de placas ocurre algo más frecuentemente en el IBD, de manera que no podría constituir un parámetro diferencial.

A la vista de los resultados de este estudio, consideramos que el estudio de los linfocitos intraepiteliales teñidos con CD3 puede aportar información para el diagnóstico diferencial entre IBD y linfoma intestinal en biopsias endoscópicas en la especie canina.

6.5.2 EXPRESIÓN DEL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR Ki-67

En este trabajo se evalúan por primera vez las diferencias en el índice de proliferación celular Ki-67 entre linfoma intestinal e IBD, encontrándose diferencias significativas entre los tres grupos de estudio. Todos los casos del grupo Linfoma presentan una expresión entre el 30 y el 62%, que se superpone tan sólo con uno de los casos del grupo DLP (47,15%) (gráfico 8 en resultados). Parece que la expresión de Ki-67 en el linfoma canino es muy variable, y difiere según el tipo histológico de linfoma con el que nos encontramos, según la clasificación de la OMS (Flood-Knapik y col., 2012), al igual que ocurre en medicina humana (Broide y col., 2009). En el linfoma multicéntrico canino se han descrito porcentajes medios de expresión que varían entre el 15 y el 65% en los diferentes trabajos publicados, y con rangos aún más amplios (Fournel-Fleury y col., 1997; Kiupel y col., 1999; Ponce y col., 2003; Zacchetti y col., 2003; Kodama y col., 2009; Flood-Knapik y col., 2012). Algunos trabajos parecen indicar que los linfomas de tipo T presentan expresiones de Ki-67 más elevadas (Ponce y col., 2003; Flood-Knapik y col., 2012).

La expresión media de Ki-67 en el grupo Linfoma en este trabajo es de $52,87 \pm 11,88$, considerablemente superior a la publicada por Ozaki y colaboradores en los once linfomas T intestinales que estudian (Ozaki y col., 2006), pero similar a la encontrada por otros autores en linfomas multicéntricos de tipo T (Ponce y col., 2003; Flood-Knapik y col., 2012). Existen varios casos de los grupos IBD y DLP de este trabajo con expresiones de Ki-67 alrededor del 20%, incluso llegando dos casos del grupo DLP a superar el 25%, porcentajes que podrían superponerse con casos de linfoma con expresiones más bajas, como ocurre en el estudio de Ozaki y colaboradores. No se han encontrado trabajos que evalúen la expresión de Ki-67 en el IBD canino, por lo tanto desconocemos si podrían existir casos con expresiones mucho más elevadas. En el IBD en medicina humana no existen prácticamente células linfoides positivas a Ki-67 en la lámina propia de íleon y colon en casos de enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (Fell y col., 1996). Consideramos que es posible que, en vista del trabajo de Ozaki y colaboradores, existan linfomas con expresiones de

Ki-67 más bajas que los casos de este estudio, o bien casos de IBD con expresiones más altas, de manera que Ki-67 no suponga una herramienta infalible en la diferenciación entre ambas enfermedades. Sin embargo, Ki-67 ha demostrado en este trabajo aportar información relevante en la diferenciación entre IBD y linfoma intestinal en biopsias endoscópicas caninas.

Considerando la sencillez de la técnica y su disponibilidad, así como los costes, creemos que puede suponer una buena herramienta de apoyo diagnóstico, además de su posible valor en el pronóstico del linfoma canino que han indicado algunos estudios (Kiupel y col., 1999; Phillips y col., 2000). El valor diagnóstico de Ki-67 ya ha sido demostrado en otro tipo de neoplasias en la especie canina, en la diferenciación del acantoma queratinizante del carcinoma de células escamosas en piel (Della Salda y col., 2002), o del histiocitoma cutáneo del tumor venéreo transmisible (Guvenç y col., 2002). En medicina humana se ha propuesto la utilización del índice de proliferación celular Ki-67 en el diagnóstico diferencial de desórdenes linfoproliferativos benignos y malignos en biopsias de ganglios linfáticos, con buenos resultados (Bryant y col., 2006).

Finalmente, como era de esperar, se ha encontrado una expresión de Ki-67 significativamente más elevada en aquellos parámetros que eran significativamente más frecuentes en el grupo Linfoma. Entre los signos clínicos, es más elevada entre los casos que presentan alteraciones del apetito moderadas o graves. En relación con la ecografía, la expresión de Ki-67 es significativamente más elevada en los casos que presentan engrosamiento de la pared de intestino delgado, pérdida de diferenciación de capas, o linfadenopatías mesentéricas, que en los que no los presentan. Asimismo, la expresión de Ki-67 es más elevada en los casos en los que durante la endoscopia se han observado soluciones de continuidad de grado grave, o una mucosa dura a la toma de biopsias. Además, se ha encontrado una correlación positiva entre la expresión de Ki-67 y el índice de gravedad clínica, así como con el índice de gravedad endoscópica. Además, a nivel histopatológico, la expresión de Ki-67 se ha relacionado significativamente con los parámetros de la WSAVA que eran significativamente más frecuentes en el grupo Linfoma (acortamiento-ensanchamiento de las vellosidades y lesión epitelial), así como con la presencia de linfocitos intraepiteliales. Además, la expresión de Ki-67 es significativamente más elevada en los casos con mayores índices de inflamación a nivel histopatológico. También se ha correlacionado la expresión de Ki-67 con otros parámetros histopatológicos más frecuentes en el grupo Linfoma, como es la pérdida de estructura de la pared intestinal. Entre los casos del grupo Linfoma,

Ki-67 se expresa más intensamente en los casos que presentan pleomorfismo celular, que constituye una de las características de malignidad tumoral; y, como es lógico, en los que presentan un índice mitótico más elevado.

Todo parece indicar que, pese a ser leves las diferencias en el cuadro clínico entre linfoma e IBD, una valoración exhaustiva de los signos del animal y de las diferentes pruebas diagnósticas disponibles puede ayudar a orientar el diagnóstico, y el índice de proliferación celular Ki-67 puede suponer, junto con el inmunofenotipo, una buena herramienta de apoyo al diagnóstico histopatológico de ambas enfermedades.

6.6 ESTUDIO DE LA CLONALIDAD DE LINFOCITOS T: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Cuando el diagnóstico histopatológico rutinario no permite el diagnóstico diferencial entre linfoma intestinal e IBD, existen nuevas modalidades diagnósticas que están en estudio. Entre ellas se encuentra el inmunofenotipaje, mediante la expresión de los marcadores CD3 y CD20, que permiten identificar el linaje del infiltrado celular, como ya se ha comentado. Esta técnica está estudiada fundamentalmente en la especie felina (Waly y col., 2005; Pohlman y col., 2009; Washabau y col., 2010; Kiupel y col., 2011; Briscoe y col., 2011). En este trabajo se ha propuesto, además, el estudio del índice de proliferación celular Ki-67 en la diferenciación de ambas enfermedades. Por otro lado, existe otra técnica en estudio, como complemento a la histopatología y al inmunofenotipaje, que son los test de clonalidad linfocitaria, mediante PCR, para identificar la reorganización del gen para la cadena γ del receptor de células T (TCR γ) y de este modo detectar poblaciones clonales de linfocitos T. Esta última técnica se ha aplicado en la diferenciación entre linfoma T intestinal y enteritis linfoplasmocitaria en la especie felina (Moore y col., 2005; Kiupel y col., 2011) y también se ha sugerido en trabajos en la especie canina (Kaneko y col., 2009; Fukushima y col., 2009; Takanosu y col., 2010), con resultados variables.

La técnica de PCR utilizada en este trabajo, la electroforesis capilar de alta resolución QIAxcell Advanced, ha mostrado bandas o picos clonales, en torno a 80-100pb, en el 75% de los casos del grupo Linfoma. Esto representa una sensibilidad algo mayor al trabajo de Fukushima y colaboradores (66,7%. Fukushima y col., 2009). En el trabajo de Fukushima y colaboradores utilizan los mismos cebadores que hemos utilizado nosotros (Burnett y col., 2003), pero emplean geles de poliacrilamida para la lectura de PCR, de manera que pensamos que la utilización del sistema QIAxcell Advanced ayuda a mejorar la resolución y la sensibilidad de la técnica. Aún así, la técnica presenta una sensibilidad menor en el presente trabajo que la descrita para otros tipos de linfoma (Burnett y col., 2003), probablemente debido a la presencia de una inflamación linfoplasmocitaria grave concomitante a las células neoplásicas en todas las biopsias endoscópicas que estudiamos, que puede llevar a que el porcentaje de células neoplásicas presentes en la muestra sea menor. Kaneko y colaboradores (2009) consiguen una sensibilidad del 100% en cuatro casos de

linfoma que estudian, en biopsias endoscópicas. En este estudio utilizan los mismos cebadores (Burnett y col., 2003); sin embargo, consideran positiva la presencia de una o más bandas distinguibles y, además, no realizan las muestras por duplicado ni utilizan técnicas heterodúplex (Kaneko y col., 2009), como es el caso del trabajo de Fukushima y colaboradores (2009), y del presente trabajo. Creemos que también por este motivo, en el trabajo de Kaneko y colaboradores, obtienen clonalidad positiva en seis casos que estaban diagnosticados histopatológicamente de enteritis. Los autores sospechan que en dos de los casos podría tratarse de un linfoma incipiente, pero los otros cuatro casos corresponderían a falsos positivos, o a una incorrecta interpretación de los resultados. Destacamos en los resultados de este estudio la ausencia de falsos positivos, ya que todos los casos del grupo IBD han resultado policlonales, lo que le otorga a la técnica una especificidad del 100%. Esta teoría está avalada por el trabajo de Takanosu y colaboradores, que encuentra bandas monoclonales en casos de enteritis al realizar una PCR convencional, que desaparecen al realizar técnicas heterodúplex, permaneciendo monoclonales las muestras de linfoma multicéntrico que incluyen en el estudio (Takanosu y col., 2010).

En el estudio de Olivero y colaboradores (2011) en el IBD canino, sólo 1 de 47 casos resulta monoclonal para el receptor de linfocitos T, y coincide con que no presenta respuesta al tratamiento tras el seguimiento clínico, de manera que los propios autores proponen que se trate de un linfoma incipiente, difícil de detectar en un diagnóstico puramente morfológico, o un estado de transición hacia un linfoma intestinal. Los resultados de este último estudio reiteran la necesidad de tomar los resultados de las PCR con cautela, siempre en contexto, y como técnica complementaria al diagnóstico morfológico, pese a ser muy rara la aparición de falsos positivos o de poblaciones clonales que no correspondan con procesos neoplásicos.

Ninguno de los casos del grupo DLP del presente trabajo, tratándose de biopsias con una sospecha de linfoma intestinal, ha mostrado monoclonalidad en las técnicas de PCR. Este hecho puede explicarse con diferentes hipótesis. Por un lado, es posible que el porcentaje de células tumorales se encuentre por debajo del límite de detección de la PCR aunque los pacientes presenten un linfoma intestinal. Puede que el infiltrado inflamatorio concomitante sea tan abundante que llegue a dificultar la detección de pequeñas poblaciones de células tumorales. En muchos de los pacientes del grupo DLP, la sospecha de linfoma estaba motivada por la presencia de un elevado número de linfocitos

intraepiteliales que formaban placas en el epitelio de revestimiento de una o varias vellosidades intestinales, pese a que la mayoría de la preparación exhibía una imagen de enteritis linfoplasmocitaria. Estos linfocitos intraepiteliales se acompañaban, en ocasiones, de acúmulos focales de linfocitos CD3+ en el ápice de las vellosidades. En medicina veterinaria el “linfoma T tipo enteropatía” ha sido poco estudiado, pero se ha sugerido que en un estado incipiente, el cambio neoplásico puede estar presente sólo en células aisladas, siendo la imagen global la de un IBD epiteliotrópico (Valli, 2007). En medicina humana incluso se está utilizando el término EATL “in situ” para casos en los que los linfocitos intraepiteliales muestran características de malignidad, pero aún no puede detectarse la presencia de linfoma (Swerdlow y col., 2008; Burke y col., 2011; Busto y col., 2011). Ninguno de los trabajos que utilizan PCR en el linfoma intestinal canino incluye descripciones histopatológicas.

En la especie felina, sin embargo, un trabajo muy completo, de Kiupel y colaboradores propone un algoritmo para el diagnóstico diferencial entre linfoma e inflamación en el intestino delgado canino, utilizando histopatología, inmunohistoquímica para el fenotipaje, y PCR para clonalidad de linfocitos. Los casos de este estudio son diagnosticados inicialmente como IBD o linfoma con técnicas histopatológicas rutinarias, para después ser diagnosticados de nuevo con los resultados inmunohistoquímicos, y todavía algunos cambiados de diagnóstico con las técnicas de PCR para clonalidad linfocitaria (Kiupel y col., 2011). Al contrario de lo que ocurre en el presente trabajo en la especie canina, en el trabajo de Kiupel y colaboradores, varios casos diagnosticados de IBD con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica fueron diagnosticados de linfoma T tras realizar clonalidad linfocitaria, corriendo las muestras en geles de agarosa por duplicado y con análisis heterodúplex (Kiupel y col., 2011). Sin embargo, en el estudio de Moore y colaboradores sobre el linfoma intestinal felino, utilizando una técnica de PCR muy parecida a la de Kiupel y colaboradores, existen una serie de casos policlonales (7/84) que en ningún caso se rediagnosticaron como IBD, indicando que existen falsos negativos en la técnica (Moore y col., 2012), al igual que ocurre en el presente trabajo, aunque en menor medida. Observando los resultados encontrados en la especie felina en el trabajo de Kiupel y colaboradores, se nos plantea otra posible hipótesis para explicar los resultados del presente trabajo. Podría ser que la presencia de un epiteliotropismo muy marcado, en forma de placas en el epitelio de revestimiento de las vellosidades intestinales, no constituya un rasgo patognomónico de linfoma intestinal, como parece suceder en la especie felina; así como tampoco la presencia de agregados de linfocitos aparentemente monomórficos CD3+ en el ápice de las

vellosidades sea un rasgo característico de linfoma, sino que puede formar parte de un cuadro de IBD grave. Quizá todos los casos del grupo DLP correspondan a casos de “IBD epiteliotrópico” de grado grave, al demostrarse su policlonalidad con las pruebas de PCR. Creemos que no podemos utilizar el término de EATL “in situ” si no existe un resultado monoclonal en la PCR que lo avale. Serían necesarios estudios con un mayor número de casos para verificar estas hipótesis y, sobre todo, estudios prospectivos que valoren la supervivencia de estos animales. Es altamente difícil realizar estudios más amplios, ya que el linfoma intestinal difuso es una enfermedad de muy baja prevalencia, no como ocurre en la especie felina, en la que es más fácil realizar estudios amplios.

La monoclonalidad linfocitaria en las pruebas de PCR, al igual que ocurría con la expresión del índice de proliferación celular Ki-67, como es lógico, se ha relacionado con algunos de los parámetros ecográficos significativamente más frecuentes en el grupo Linfoma, como son el engrosamiento de la pared intestinal y la pérdida de diferenciación de capas. De entre los parámetros endoscópicos se ha relacionado significativamente también con la ausencia de mucosa friable y la presencia de un grado intenso de soluciones de continuidad, además de con el índice de gravedad endoscópica.

Al observar los resultados de las PCR del presente trabajo en conjunto con los parámetros histopatológicos, como era de esperar, encontramos una asociación entre la presencia de monoclonalidad linfocitaria con los parámetros que eran significativamente más frecuentes en el grupo Linfoma, el acortamiento-ensanchamiento de vellosidades, la lesión epitelial y la presencia de linfocitos intraepiteliales tanto en el epitelio superficial como en las criptas.

Consideramos de interés el estudio de las muestras monoclonales dentro del grupo Linfoma. Pese a que consideramos que las muestras policlonales de este grupo corresponden a falsos negativos, nos parece interesante analizar las características que tienen en común. La pérdida de estructura de la pared intestinal es significativamente más frecuente entre las muestras monoclonales del grupo Linfoma, sin embargo, no lo consideramos significativo, dado que una de las dos muestras policlonales también la presentaba. Consideramos que se trata de un resultado que habría que tener en cuenta en futuros estudios más amplios, pero que carece de significación en el presente estudio. Curiosamente los casos que han resultado monoclonales en las técnicas de PCR coinciden con los casos de células grandes, mientras que los policlonales coinciden con los dos casos de células pequeñas, en los que no había pleomorfismo celular. Esto da

qué pensar, ya que los casos del grupo DLP probablemente, si llegasen a ser considerados en algún caso linfomas, probablemente serían linfomas de células pequeñas. No hemos encontrado alusión al tamaño celular de los linfomas en ninguno de los trabajos que utiliza PCR en el linfoma intestinal en la especie canina (Kaneko y col., 2009; Fukushima y col., 2009; Takanosu y col., 2010). Quizá gran parte del infiltrado de células pequeñas se corresponda con un infiltrado inflamatorio, y el porcentaje de células neoplásicas sea menor, o puede que simplemente se trate de un hallazgo casual, que no aparecería en estudios con un mayor número de casos.

Como era de esperar, la expresión de Ki-67 ha resultado significativamente más elevada en los casos monoclonales por PCR, teniendo en cuenta los 32 perros totales del estudio, ya que era significativamente más alta en los casos del grupo Linfoma. Sin embargo, lo que resulta inesperado es que, dentro del grupo Linfoma, los casos monoclonales por PCR presentan una expresión de Ki-67 significativamente superior a los que resultaron policlonales. Una posible explicación sería que los linfomas monoclonales son todos ellos de células grandes, y la mayoría con mayor pleomorfismo celular, que podrían tener un mayor potencial mitótico que las células pequeñas y, por tanto, mejor diferenciadas de los casos policlonales. Esto coincide con lo publicado en el linfoma multicéntrico canino, en el que los linfomas de alto grado presentan un índice de proliferación celular Ki-67 mayor que los de bajo grado (Fournel-Fleury y col., 1997; Ponce y col., 2003).

6.7 CONSIDERACIONES FINALES DESPUÉS DEL ESTUDIO EN CONJUNTO DE LOS RESULTADOS

Este es el primer trabajo que analiza el cuadro completo del linfoma T intestinal tipo enteropatía y el IBD grave en los casos en los que es necesario realizar un diagnóstico diferencial en la especie canina, evaluando todas las técnicas disponibles o en estudio para su diferenciación. El diagnóstico diferencial entre linfoma intestinal difuso e IBD grave en la especie canina requiere el estudio conjunto de todos los datos de que dispongamos. No podemos analizar los resultados de ninguna de las pruebas de manera aislada, ya que se trata de complementar los datos que van aportando las distintas técnicas. Es posible que el cuadro clínico no muestre diferencias y aporte poca información de cara al diagnóstico diferencial, aunque sí nos puede orientar si se trata de un caso grave en el que es necesario realizar otras pruebas. Los parámetros ecográficos pueden guiar el diagnóstico y confirmar la utilidad de la endoscopia para la toma de biopsias y el posterior estudio histopatológico, en función de la localización y extensión del proceso. La endoscopia resulta una técnica mínimamente invasiva con escasa repercusión en el paciente, útil para la obtención de biopsias intestinales, pero que puede presentar limitaciones para el diagnóstico histopatológico. Además de servir como medio para la obtención de biopsias, la imagen endoscópica puede proporcionarnos una información útil de cara a orientar el diagnóstico diferencial entre las dos patologías.

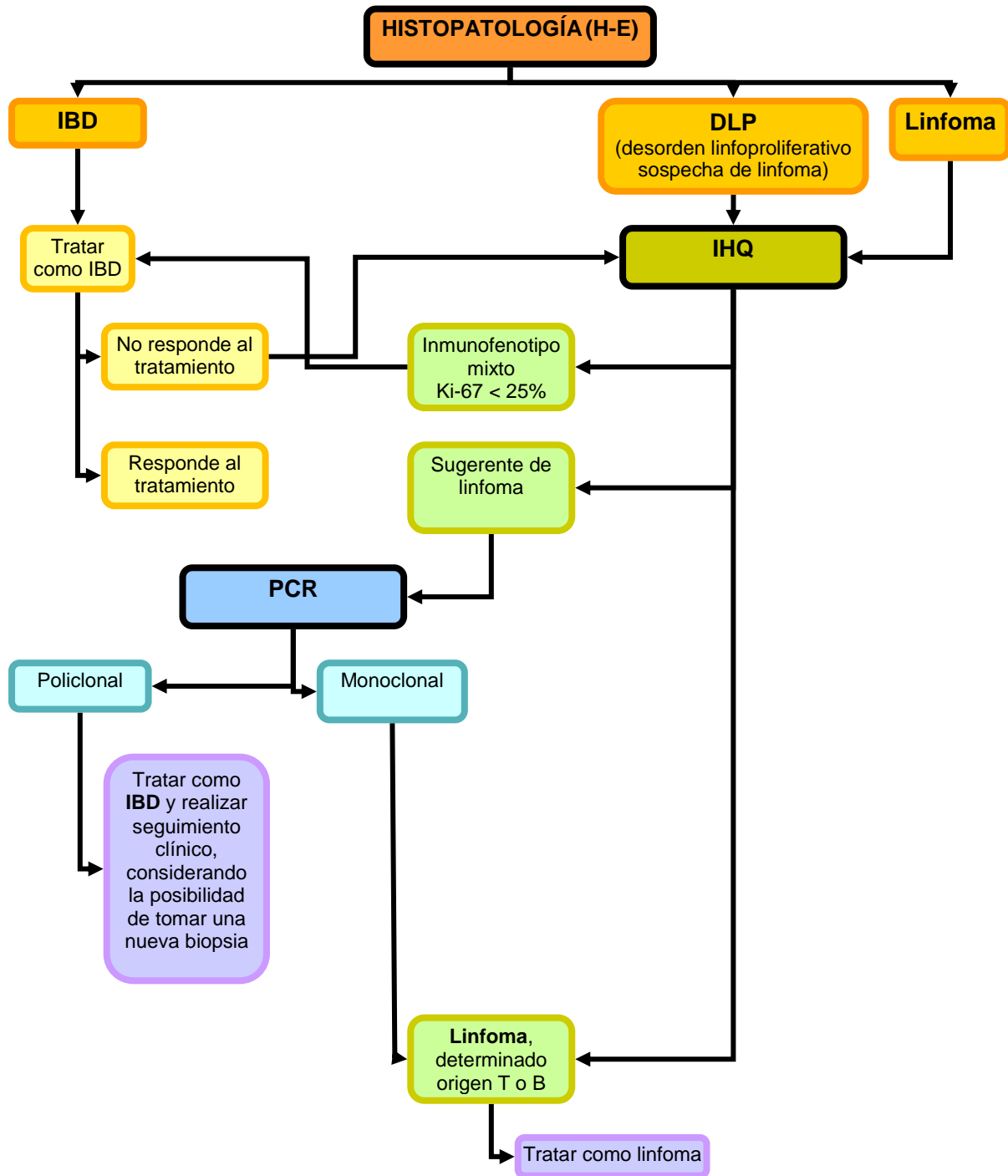
El estudio histopatológico de las biopsias intestinales es esencial para el diagnóstico diferencial entre linfoma intestinal difuso e IBD grave, aunque puede no ser suficiente. El estudio de los parámetros publicados por la WSAVA (Day y col., 2008) puede dirigir el diagnóstico, pero son necesarios otros parámetros para emitir un diagnóstico de linfoma intestinal. Los resultados de este trabajo demuestran que un número considerable de biopsias endoscópicas presentan un diagnóstico histopatológico que varía al combinarlo con otras técnicas. Si el estudio histopatológico del infiltrado linfocitario no es suficiente para determinar el diagnóstico, la realización de técnicas inmunohistoquímicas para el inmunofenotipaje y el establecimiento del índice de proliferación celular Ki-67 de las lesiones pueden suponer un complemento de gran ayuda, con una inversión económica asequible para muchos propietarios, y con disponibilidad para realizarse en varios laboratorios de nuestro país. Además, se realiza en tejidos

en parafina, de manera que sólo son necesarias las biopsias que se toman de forma sistemática para un diagnóstico general.

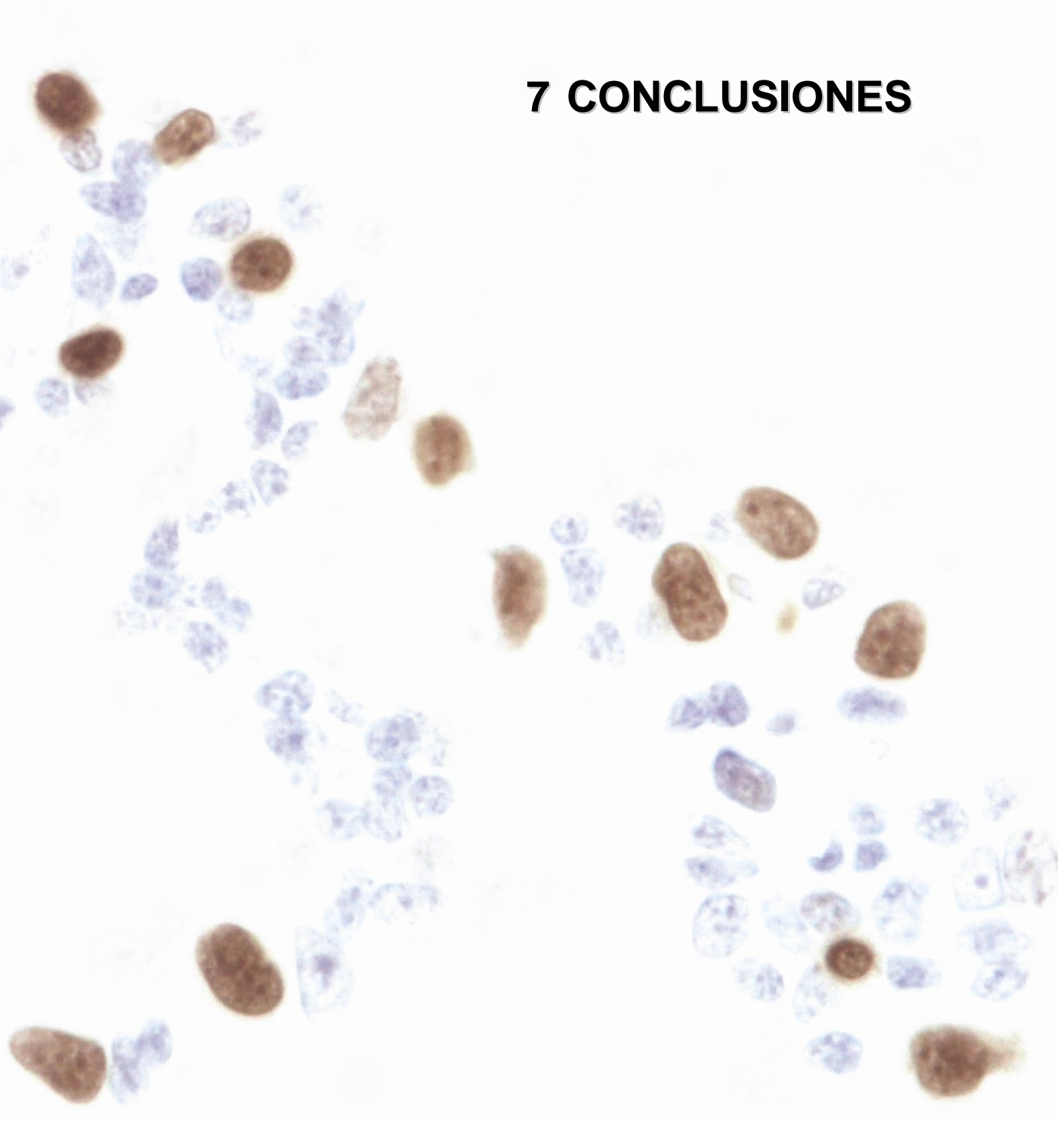
Las técnicas de PCR para clonalidad de linfocitos T con sistemas capilares de alta resolución pueden ayudar a establecer un diagnóstico definitivo de linfoma T-intestinal en caso de presentar resultados monoclonales, aunque un resultado policlonal en estas técnicas no puede descartar la presencia de un linfoma intestinal incipiente. En estos casos, será necesario valorar el resto de pruebas, e incluso la respuesta al tratamiento, pudiendo recomendarse, en caso necesario, la toma de una nueva biopsia, o incluso la obtención de biopsias excisionales, que pueden resultar más adecuadas para detectar linfomas incipientes (Evans y col., 2006). La combinación de las técnicas aquí presentadas mejora notablemente la capacidad para realizar un diagnóstico diferencial entre las dos patologías en biopsias endoscópicas, pero no podemos olvidar que las biopsias excisionales pueden aportarnos información, como la infiltración de capas profundas, que puede resultar crucial en la diferenciación linfoma intestinal/IBD grave. Las técnicas de PCR no están disponibles a nivel clínico en Europa, pero sí se están ofreciendo en dos centros de Estados Unidos: el Diagnostic Center for Population and Animal Health de la Universidad de Michigan, y en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de California, Davis.

Para terminar, queremos enfatizar la necesidad de combinar el estudio de la histopatología, el inmunofenotipo, el índice de proliferación celular Ki-67 y los resultados de PCR en conjunto antes de emitir un diagnóstico final (Washabau y col., 2010). Además, consideramos que la histopatología y el inmunofenotipaje (en este orden) deben preceder al estudio de la clonalidad por PCR, de manera que estas pruebas sólo sean interpretadas en el contexto adecuado. Sólo en caso de que el diagnóstico histopatológico indique un linfoma o una sospecha de linfoma será necesario realizar inmunohistoquímica (Kiupel y col., 2011). No podemos olvidar que la diferenciación entre IBD grave y linfoma T intestinal tipo enteropatía es esencial de cara a elegir un tratamiento adecuado y poder establecer un pronóstico más preciso. Por ello, en este trabajo se propone un algoritmo para el diagnóstico diferencial entre linfoma intestinal e IBD grave en biopsias endoscópicas, que incluimos a continuación.

6.8 PROPUESTA DE ALGORITMO PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE LINFOMA INTESTINAL E IBD EN BIOPSIAS ENDOSCÓPICAS CANINAS



7 CONCLUSIONES

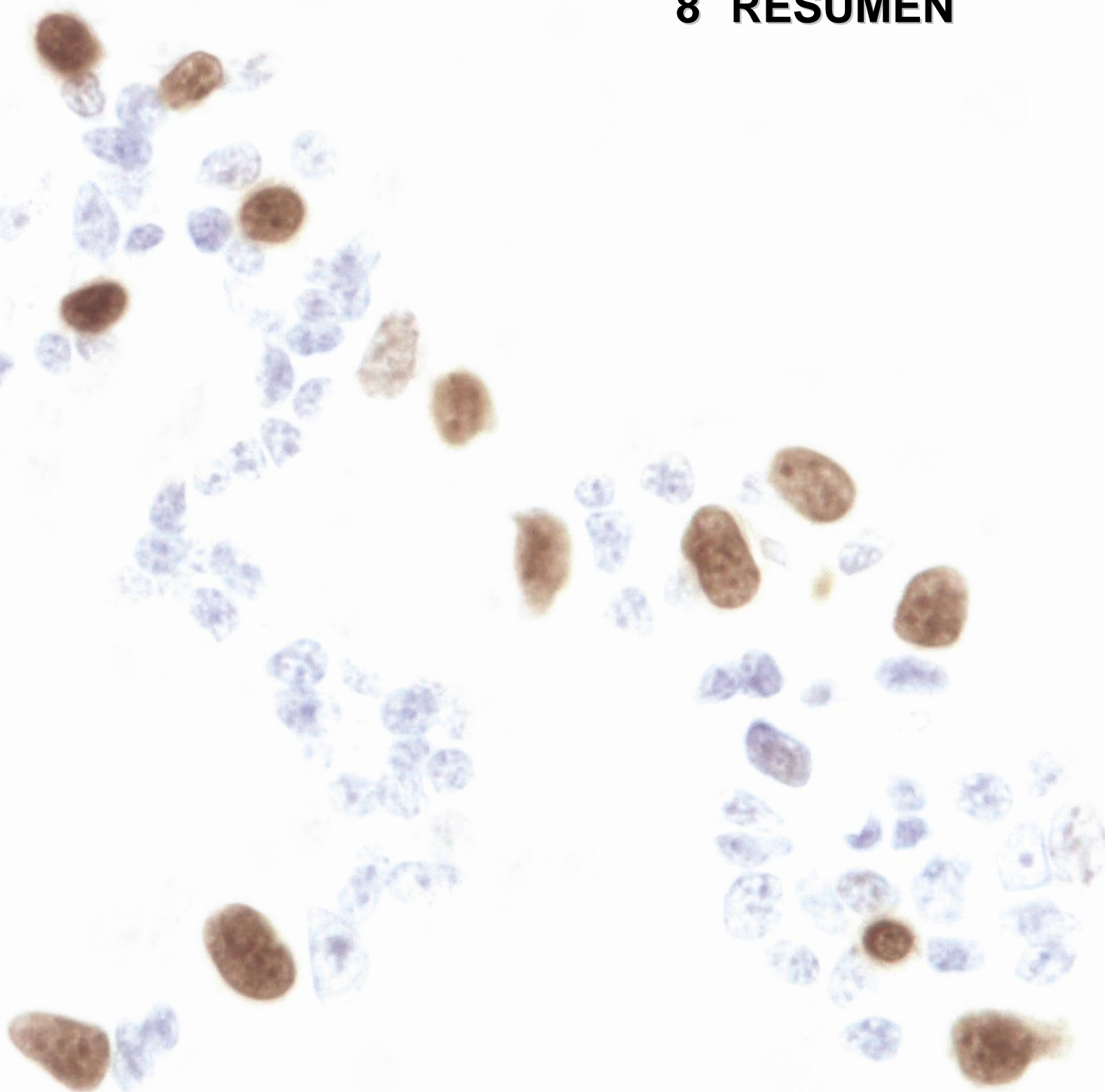


Las conclusiones finales de este trabajo son las siguientes:

1. La presentación clínica del linfoma intestinal difuso y el IBD grave no muestra diferencias significativas en cuanto a motivo de consulta, sintomatología, palpación abdominal y alteraciones en la analítica sanguínea. Los hallazgos ecográficos de engrosamiento de la pared intestinal y pérdida de diferenciación de capas son significativamente más frecuentes en el linfoma intestinal ($p = 0,020$ y $p = 0,001$ respectivamente).
2. El aspecto endoscópico de las lesiones presentes en el linfoma intestinal difuso y en el IBD grave, correspondiente a una mucosa engrosada, congestiva e irregular, no presenta diferencias significativas. En cuanto a la consistencia de la mucosa a la toma de biopsias sí se encuentran diferencias significativas entre ambas enfermedades, siendo más frecuentemente friable en el IBD grave ($p = 0,015$), y dura en el linfoma intestinal ($p = 0,006$).
3. Tanto los perros con linfoma intestinal como los perros con IBD grave presentan alteraciones importantes en los parámetros histopatológicos propuestos por la WSAVA. Son significativamente más intensos en el grupo Linfoma el acortamiento-ensanchamiento de vellosidades ($p = 0,022$) y la lesión epitelial ($p = 0,004$). El índice de la WSAVA es significativamente mayor en el grupo Linfoma ($p = 0,005$). La pérdida de estructura de la pared intestinal a nivel histológico es significativamente más frecuente en el grupo Linfoma que en el IBD ($p < 0,001$).
4. La utilización de los marcadores CD3 y CD20 resulta clave en la caracterización de las lesiones estudiadas. Esto cambia el diagnóstico inicial realizado con técnicas rutinarias, permitiendo el establecimiento de los grupos utilizados en este trabajo.
5. El estudio del inmunofenotipo demuestra que los linfomas intestinales difusos que afectan a duodeno son en su mayoría de tipo T, representando el 100% de los casos incluidos en este trabajo. Todos corresponden a la entidad Linfoma T Asociado a Enteropatía (EATL) de la OMS. Son más frecuentes los linfomas de células grandes (EATL tipo I, 75%), que los de células pequeñas (EATL tipo II, 25%). Todos ellos presentan epiteliotropismo, rasgo característico de la EATL en el perro.

6. El marcador CD3 ha resultado ser una excelente herramienta para el estudio de los linfocitos intraepiteliales. Estos linfocitos T se localizan en el epitelio tanto superficial como de las criptas de manera significativamente más frecuente en el grupo Linfoma ($p = 0,002$). La presencia de linfocitos intraepiteliales formando placas en el epitelio de revestimiento es significativamente menor en el grupo IBD ($p = 0,019$).
7. La expresión inmunohistoquímica del índice de proliferación celular Ki-67 es significativamente superior en el grupo Linfoma que en los otros dos grupos ($p < 0,001$). Este índice se correlaciona con la gravedad clínica ($r = 0,350$; $p = 0,049$) y endoscópica ($r = 0,370$; $p = 0,037$), así como con el índice de inflamación a nivel histopatológico de la WSAVA ($r = 0,518$; $p = 0,002$).
8. La detección de clonalidad de linfocitos T mediante técnicas de PCR con electroforesis capilar de alta resolución presenta una sensibilidad del 75% en el grupo Linfoma. La especificidad de la técnica es del 100% en este grupo.
9. El grupo DLP se caracteriza por la presencia de focos linfocitarios CD3+ en la lámina propia de las vellosidades intestinales y/o por una infiltración masiva de linfocitos intraepiteliales CD3+ en forma de placas en una o varias vellosidades. El estudio de la clonalidad de estos casos con la técnica de PCR refleja la presencia de una población linfocitaria policlonal. Estos resultados sugieren un proceso inflamatorio con marcado epiteliotropismo, por lo que podríamos hablar de un “IBD epiteliotrópico grave”. No obstante, la policlonalidad mostrada con PCR de algunos linfomas de nuestro trabajo (25%) no permite descartar que algunos casos del grupo DLP pudieran ser linfomas incipientes.
10. Los resultados ponen de manifiesto la necesidad de combinar las distintas pruebas disponibles para emitir un diagnóstico final. Por ello, en este trabajo se propone la utilización de una secuencia ordenada de pruebas en forma de algoritmo, que facilite el diagnóstico de desórdenes linfoproliferativos en biopsias endoscópicas caninas: 1º) empleo del diagnóstico histopatológico; 2º) estudio inmunohistoquímico del inmunofenotipo (CD3 y CD20) y del índice de proliferación celular Ki-67, 3º) aplicación de las técnicas de PCR para determinar la clonalidad linfocitaria.

8 RESUMEN



El linfoma intestinal y la enfermedad inflamatoria crónica intestinal (IBD) son enfermedades relevantes en el perro, ya que son responsables de un gran número de cuadros de diarrea crónica y vómito crónico en esta especie. Ambas enfermedades pueden compartir cuadro clínico, haciéndose esencial su diagnóstico diferencial, ya que su tratamiento y pronóstico son muy diferentes. Su diagnóstico diferencial se basa en el estudio histopatológico de biopsias intestinales. Sin embargo, cuando el IBD es de carácter grave y el linfoma intestinal aparece de forma difusa, este diagnóstico no siempre resulta sencillo, especialmente en biopsias endoscópicas. Por esta razón, en este trabajo nos hemos planteado estudiar métodos diagnósticos complementarios como son el inmunofenotipo, el índice de proliferación celular Ki-67 y las técnicas de PCR para clonalidad de linfocitos T para realizar un diagnóstico diferencial de ambas enfermedades.

Para ello hemos seleccionado 32 perros con enfermedades digestivas graves de tipo difuso a los que se les había realizado endoscopia digestiva superior con toma de biopsias. Estos perros se dividieron en tres grupos tras analizar las biopsias con H-E y con los marcadores leucocitarios CD3 y CD20. Los grupos fueron: grupo Linfoma ($n = 8$), grupo IBD ($n = 15$) y grupo DLP (desorden linfoproliferativo, $n = 9$). En el grupo DLP se incluyeron aquellos perros en los que existía una sospecha de linfoma intestinal, pero sin un diagnóstico histopatológico claro.

Los resultados de este estudio demuestran que no existen diferencias significativas en cuanto al motivo de consulta, cuadro clínico y analítica sanguínea entre los distintos grupos. Los datos ecográficos revelan que tanto el engrosamiento de la pared intestinal como la pérdida de diferenciación de capas son significativamente más frecuentes en el linfoma intestinal ($p = 0,020$ y $p = 0,001$ respectivamente). El aspecto endoscópico de las lesiones es similar en los tres grupos, con una mucosa engrosada, congestiva e irregular, pudiendo encontrarse soluciones de continuidad o puntos blancos. La consistencia de la mucosa a la toma de biopsias presenta diferencias significativas entre ambas enfermedades, siendo más frecuentemente friable en el IBD grave ($p = 0,015$), y más frecuentemente dura en el linfoma intestinal ($p = 0,006$).

Se han estudiado los parámetros histopatológicos propuestos por la WSAVA para la valoración de la inflamación intestinal en biopsias endoscópicas (Day y col., 2008). En todos los casos del grupo Linfoma existe un intenso infiltrado inflamatorio asociado al proceso neoplásico, de manera que el índice de inflamación histopatológica ha resultado significativamente más elevado en el grupo Linfoma que en los otros dos grupos ($p = 0,005$). Son significativamente más intensos en el grupo Linfoma el acortamiento-ensanchamiento de vellosidades ($p = 0,022$) y la lesión epitelial ($p = 0,004$). La pérdida de estructura

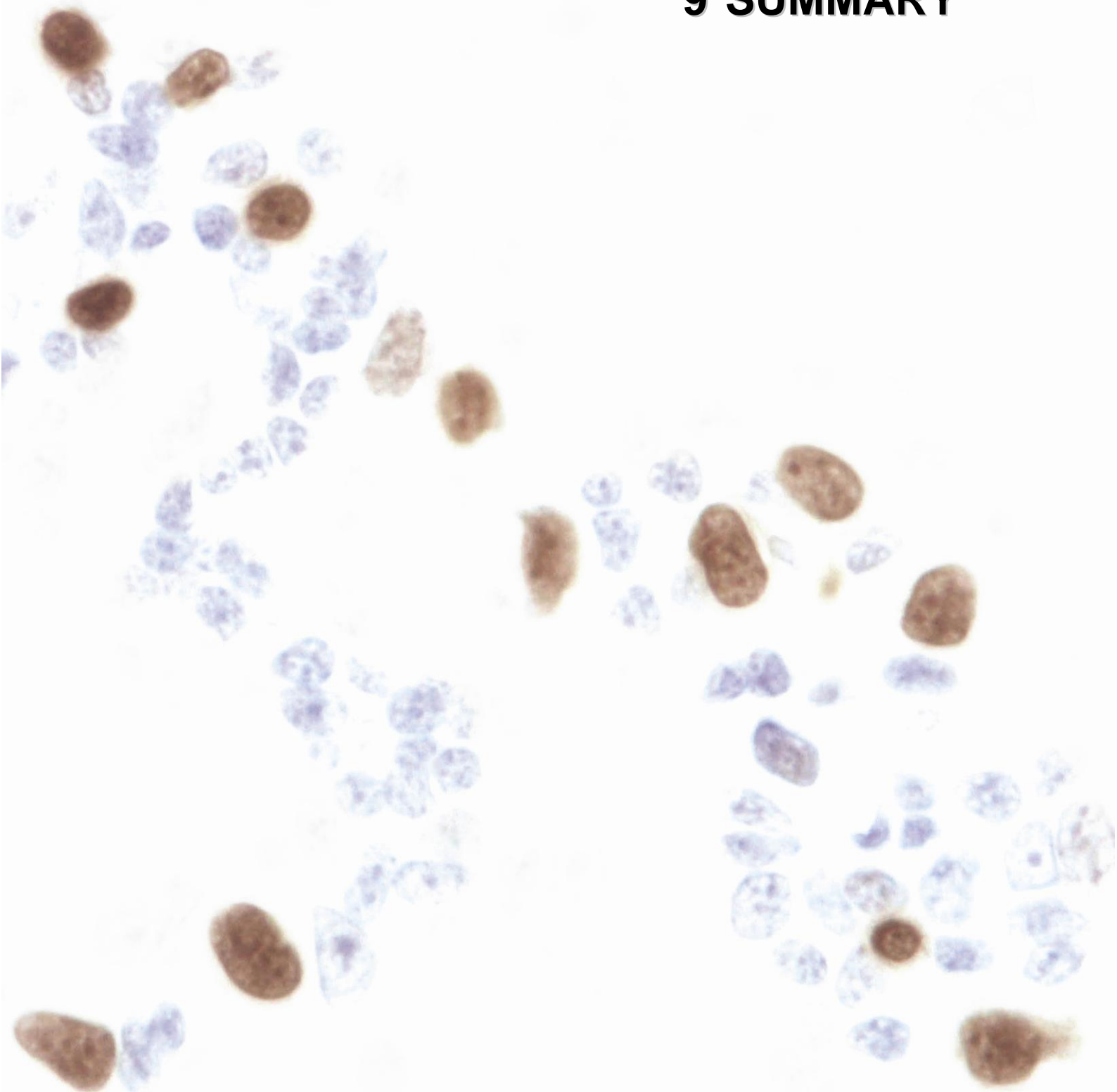
de la pared intestinal es significativamente más frecuente en el linfoma intestinal que en el IBD ($p < 0,001$).

El estudio del inmunofenotipo ha permitido concretar el diagnóstico de varios casos, así como establecer de los grupos que se han utilizado a lo largo de este trabajo. La realización de técnicas inmunohistoquímicas para los marcadores linfocitarios CD3 y CD20 ha puesto de manifiesto que el linfoma intestinal canino es mucho más frecuente de tipo T. El 100% de los casos del grupo Linfoma presentan inmunofenotipo T, y un epiteliotropismo marcado. Todos ellos se corresponden con la entidad linfoma T asociado a enteropatía o tipo enteropatía (EATL) de la OMS, propuesto para medicina humana (Swerdlow y col., 2008). El EATL tipo I, de células grandes, ha resultado más frecuente (75%) que el EATL tipo II, de células pequeñas (25%). El marcador CD3 se ha utilizado para el estudio de los linfocitos intraepiteliales, presentes en los tres grupos de estudio. Éstos se localizan tanto en el epitelio tanto superficial como de las criptas, de manera significativamente más frecuente en el grupo Linfoma ($p = 0,002$). Además, la presencia de linfocitos formando placas en el epitelio de revestimiento es significativamente menor en el grupo IBD ($p = 0,019$). La expresión inmunohistoquímica del índice de proliferación celular Ki-67 aporta información en la diferenciación linfoma intestinal / IBD grave, ya que es significativamente superior en el grupo Linfoma que en los otros dos grupos ($p < 0,001$).

La detección de la clonalidad de linfocitos T mediante técnicas de PCR por electroforesis capilar de alta resolución ha presentado una sensibilidad del 75% en el grupo Linfoma. Todos los casos de los grupos DLP e IBD han resultado policlonales, de modo que la especificidad de la técnica es del 100%. Este resultado en la técnica de PCR del grupo DLP, unido a la infiltración masiva de linfocitos intraepiteliales CD3 positivos en forma de placas en el epitelio de una o varias vellosidades intestinales, sugiere un proceso inflamatorio con marcado epiteliotropismo, por lo que podríamos hablar de un “IBD epiteliotrópico grave”. Esto indica que el epiteliotropismo linfocitario en forma de placas no es un rasgo patognomónico del linfoma intestinal canino, a diferencia de lo que se ha sugerido en la especie felina. No obstante, la policlonalidad mostrada por algunos linfomas de este trabajo (25%), no permite descartar que, en algunos casos del grupo DLP, pueda tratarse de linfomas incipientes.

Así, basándonos en los resultados obtenidos, se ha propuesto un algoritmo para el diagnóstico diferencial entre linfoma intestinal e IBD grave en biopsias endoscópicas caninas, que incluye de forma secuencial las pruebas incluidas en este trabajo: 1º) empleo del diagnóstico histopatológico, 2º) estudio inmunohistoquímico del inmunofenotipo y el índice de proliferación celular Ki-67 y, 3º) aplicación de las técnicas de PCR para determinar la clonalidad linfocitaria.

9 SUMMARY



Inflammatory bowel disease (IBD) and small intestinal lymphoma are relevant diseases in canines, responsible of a large number of cases of chronic vomiting and diarrhea. Both conditions share clinical presentation; however, a correct diagnosis is essential for proper treatment and prognosis. The differentiation of intestinal lymphoma from IBD is based on the histological evaluation of intestinal biopsy specimens. However, when IBD is severe and intestinal lymphoma diffuse, the differential diagnosis can be difficult, especially in endoscopic biopsies. For this reason, this study focuses on the evaluation of complementary diagnostic procedures such as immunophenotyping, proliferation index Ki-67 and PCR to determine clonality of the infiltrating cells, in order to establish a differential diagnosis between the two diseases.

Endoscopic intestinal biopsies from 32 dogs that presented with diffuse, severe, intestinal disease were selected. All dogs were divided into three groups after morphologic evaluation with routine stains and assessment of CD3 and CD20 stained slides. Groups were: Lymphoma group (n = 9), IBD group (n = 8), and LPD group (lymphoproliferative disorder, n = 9). LPD group included dogs with a non conclusive diagnosis of lymphoma suspect.

Results of the current study demonstrate no significant differences among groups in terms of presenting complaint, clinical signs and blood tests. Ultrasonographic data revealed that increased intestinal wall thickness and loss of intestinal wall layers are significantly more frequent in Lymphoma group ($p = 0,020$ and $p = 0,001$ respectively). Endoscopic visualization of the intestinal mucosa is similar within the three groups, showing an irregular, hyperemic mucosa, with the presence of erosions or white foci in some animals. Mucosal consistency at the time of biopsy collection differed significantly among groups. Friability was more frequent in IBD group ($p = 0,015$) whereas increased mucosal consistency was more frequent in Lymphoma group. WSAVA histopathological standards for the diagnosis of intestinal inflammation in endoscopic biopsy samples (Day *et al.*, 2008) were evaluated. All cases of Lymphoma group presented an inflammatory background, associated with the neoplastic process. WSAVA index appeared significantly higher in Lymphoma group ($p = 0,005$). Furthermore, villous stunting and villous epithelial injury were significantly more intense in Lymphoma group ($p = 0,022$ and $p = 0,004$ respectively).

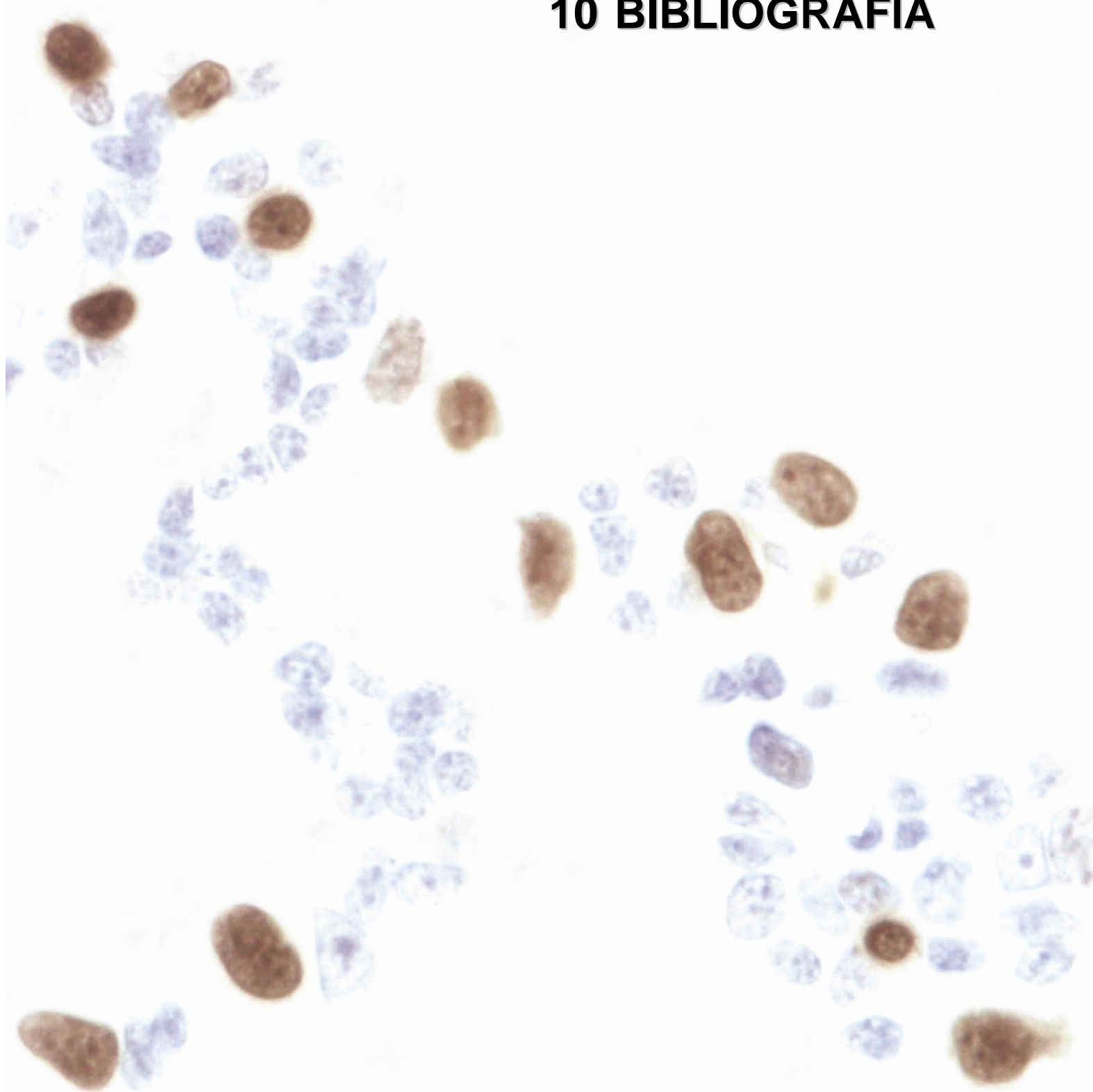
Immunophenotyping allowed reclassification of several cases. Immunohistochemical detection of CD3 and CD20 revealed that primary small intestinal T cell lymphomas are far more common than B cell lymphomas in dogs. All cases of Lymphoma group were of T-cell immunophenotype and epitheliotropism was a predominant feature. The characteristics of all these lymphomas closely matched the WHO entity "Enteropathy Associated T-cell Lymphoma (EATL)" proposed for human medicine (Swerdlow *et al.*, 2008).

Type I EATL (large cell lymphoma) was more frequently seen in our cases (75%) when compared to type II EATL (small cell lymphoma, 25%). CD3 positive intraepithelial lymphocytes were located in both surface and crypt epithelium more frequently in Lymphoma group ($p = 0,002$). Moreover, intraepithelial plaques were significantly less frequent in IBD group ($p = 0,019$). Immunohistochemical expression of proliferative index Ki-67 adds valuable information to the differential diagnosis between intestinal lymphoma and IBD, since it is significantly higher in Lymphoma group ($p < 0,001$).

The T-cell clonality analysis by high resolution capillary electrophoresis had 75% sensitivity in Lymphoma group. All cases of IBD and LPD groups were polyclonal, therefore the technique reached 100% specificity. LPD group results of polyclonality, together with the frequency of intraepithelial plaques in single or several villi, suggests an inflammatory process with severe epitheliotropism. This condition could be named as “epitheliotropic severe IBD”. Based on these data, severe epitheliotropism forming plaques within the epithelium could not be a pathognomonic feature of intestinal lymphoma in canines, as it has been suggested in the feline species. However, the finding of polyclonality in 25% of lymphomas of this study does not rule out the possibility that some LPD case might represent early stage lymphomas.

Based on the data presented here, a diagnostic algorithm for small intestinal endoscopic biopsies of canines is proposed. It includes the tests presented in this study in a stepwise strategy, as follows: 1) histopathological assessment, 2) immunohistochemical study of immunophenotype (CD3 and CD20) and proliferative index Ki-67, and 3) PCR to determine lymphocyte clonality.

10 BIBLIOGRAFÍA



1. Abadie JJ, Amardeilh MA, Delverdier ME (1999) Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *J Am Vet Med Assoc* 215, 1629-1634.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2008) Propiedades generales de las respuestas inmunitarias" en *Inmunología celular y molecular*, eds. AK Abbas, AH Lichtman, S Pillai, Sexta ed, Saunders Elsevier, Barcelona, España, pp. 3-17.
3. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2008) Células y tejidos del sistema inmunitario adaptativo en *Inmunología celular y molecular*, eds. AK Abbas, AH Lichtman, S Pillai, Sexta ed, Saunders Elsevier, Barcelona, España, pp. 47-72.
4. Abbo AH, Lucroy MD (2007) Assessment of anemia as an independent predictor of response to chemotherapy and survival in dogs with lymphoma: 96 cases (1993-2006). *J Am Vet Med Assoc* 231, 1836-1842.
5. Allenspach K, Rüfenacht S, Sauter S et al. (2006) Pharmacokinetics and clinical efficacy of cyclosporine treatment of dogs with steroid-refractory inflammatory bowel disease. *J Vet Intern Med* 20, 239-244.
6. Allenspach K, Wieland B, Gröne A et al. (2007) Chronic enteropathies in dogs: evaluation of risk factors for negative outcome. *J Vet Intern Med* 21, 700-708.
7. Aqel N, Barker F, Patel K et al. (2008) In-situ mantle cell lymphoma--a report of two cases. *Histopathology* 52, 256-260.
8. Arora N, Manipadam MT, Pulimood A et al. (2011) Gastrointestinal lymphomas: pattern of distribution and histological subtypes: 10 years experience in a tertiary centre in South India. *Indian J Pathol Microbiol* 54, 712-719.
9. Askling J, Brandt L, Lapidus A et al. (2005) Risk of haematopoietic cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 54, 617-622.
10. Barrs VR, Beatty JA (2012a) Feline alimentary lymphoma: 1. Classification, risk factors, clinical signs and non-invasive diagnostics. *J Feline Med Surg* 14, 182-190.
11. Barrs VR, Beatty JA (2012b) Feline alimentary lymphoma: 2. Further diagnostics, therapy and prognosis. *J Feline Med Surg* 14, 191-201.
12. Baum B, Meneses F, Kleinschmidt S et al. (2007) Age-related histomorphologic changes in the canine gastrointestinal tract: a histologic and immunohistologic study. *World J Gastroenterol* 13, 152-157.
13. Bennett MH, Farrer-Brown G., Henry K et al (1974). Classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet*, 2:405-406.
14. Bergman PJ, Ogilvie GK, Powers BE (1996) Monoclonal antibody C219 immunohistochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 10, 354-359.
15. Bonfanti U, Bertazzolo W, Bottero E et al. (2006) Diagnostic value of cytologic examination of gastrointestinal tract tumors in dogs and cats: 83 cases (2001-2004). *J Am Vet Med Assoc* 229, 1130-1133.
16. Bonfanti U, Bussadori C, Zatelli A et al. (2004) Percutaneous fine-needle biopsy of deep thoracic and abdominal masses in dogs and cats. *J Small Anim Pract* 45, 191-198.

17. Bosman FT (2010) WHO Classification of Tumours of the digestive system (4th ed). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer
18. Bradley K. (2009). The small intestine. En O'Brien R, Barr F (Ed). BSAVA Manual of Canine and Feline Abdominal Image. BSAVA.
19. Briscoe KA, Krockenberger M, Beatty JA et al. (2011) Histopathological and immunohistochemical evaluation of 53 cases of feline lymphoplasmacytic enteritis and low-grade alimentary lymphoma. J Comp Pathol 145, 187-198.
20. Bronson RT (1982) Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. Am J Vet Res 43, 2057-2059.
21. Brown CC, Baker DC, Barker IK (2007). The alimentary system. En M. Grant Maxie (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5^a 3d. (pp.1-296). Philadelphia, USA: Elsevier Saunders.
22. Brown DC, Gatter KC (1990) Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. Histopathology 17, 489-503.
23. Broyde A, Boycov O, Strenov Y et al. (2009) Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. Am J Hematol 84, 338-343.
24. Bryant R, Banks P, O'Malley D (2006) Ki67 staining pattern as a diagnostic tool in the evaluation of lymphoproliferative disorders. Histopathology 48, 505-515.
25. Burke JS (2011) Lymphoproliferative disorders of the gastrointestinal tract: a review and pragmatic guide to diagnosis. Arch Pathol Lab Med 135, 1283-1297.
26. Burnett RC, Vernau W, Modiano JF et al. (2003) Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. Vet Pathol 40, 32-41.
27. Busto Bea V, Crespo Pérez L, Rodríguez-Gandía M et al. (2011) [Enteropathy-associated T-cell lymphoma: a diagnostic challenge]. Gastroenterol Hepatol 34, 686-689.
28. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL et al. (2011) The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. Blood 117, 5019-5032.
29. Carreras JK, Goldschmidt M, Lamb M et al. (2003) Feline epitheliotropic intestinal malignant lymphoma: 10 cases (1997-2000). J Vet Intern Med 17, 326-331.
30. Carter RF, Valli VE, Lumsden JH (1986) The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation. Can J Vet Res 50, 154-164.
31. Casamian-Sorrosal D, Willard MD, Murray JK et al. (2010) Comparison of histopathologic findings in biopsies from the duodenum and ileum of dogs with enteropathy. J Vet Intern Med 24, 80-83.
32. Cesari A, Bettini G, Vezzali E (2009) Feline intestinal T-cell lymphoma: assessment of morphologic and kinetic features in 30 cases. J Vet Diagn Invest 21, 277-279.
33. Choi DH, Kim S, Rimm DL et al. (2005) Immunohistochemical biomarkers in patients with early-onset breast carcinoma by tissue microarray. Cancer J 11, 404-411.
34. Chott A (1999) [Problems in biopsy differential diagnosis in lymphomas of the small and large intestines]. Verh Dtsch Ges Pathol 83, 90-100.

35. Chott A, Vesely M, Simonitsch I et al. (1999) Classification of intestinal T-cell neoplasms and their differential diagnosis. *Am J Clin Pathol* 111, S68-74.
36. Chu PG, Arber DA (2001) CD79: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9, 97-106.
37. Claessen MM, Siersema PD, Vleggaar FP (2011) IBD-related carcinoma and lymphoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25 Suppl 1, S27-38.
38. Cohen M, Bohling MW, Wright JC et al. (2003) Evaluation of sensitivity and specificity of cytologic examination: 269 cases (1999-2000). *J Am Vet Med Assoc* 222, 964-967.
39. Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J et al. (2002) In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood* 99, 3376-3382.
40. Cooper MD, Peterson RD, Good RA (1965) Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken. *Nature* 205, 143-146.
41. Couto CG, Rutgers HC, Sherding RG et al. (1989) Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs. A retrospective study. *J Vet Intern Med* 3, 73-78.
42. Coyle K, Steinberg H (2004) Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma. *Vet Pathol* 41, 141-146.
43. Craven M, Simpson JW, Ridyard AE et al. (2004) Canine inflammatory bowel disease: retrospective analysis of diagnosis and outcome in 80 cases (1995-2002). *J Small Anim Pract* 45, 336-342.
44. Crow SE (1985) Tumors of the alimentary tract. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 15, 577-596.
45. Cui J, Dong BW, Liang P et al. (2004) Effect of c-myc, Ki-67, MMP-2 and VEGF expression on prognosis of hepatocellular carcinoma patients undergoing tumor resection. *World J Gastroenterol* 10, 1533-1536.
46. Dandrieux J, Bornand V, Doherr M et al. (2008) Evaluation of lymphocyte apoptosis in dogs with inflammatory bowel disease. *Am J Vet Res* 69, 1279-1285.
47. Day MJ, Bilzer T, Mansell J et al. (2008) Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *J Comp Pathol* 138 Suppl 1, S1-43.
48. Delabie J, Holte H, Vose JM et al. (2011) Enteropathy-associated T-cell lymphoma: clinical and histological findings from the international peripheral T-cell lymphoma project. *Blood* 118, 148-155.
49. Delaney F, O'Brien RT, Waller K (2003) Ultrasound evaluation of small bowel thickness compared to weight in normal dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 44, 577-580.
50. Della Salda L, Preziosi R, Mazzoni M et al. (2002) Cell proliferation patterns in canine infundibular keratinizing acanthoma and well differentiated squamous cell carcinoma of the skin. *Eur J Histochem* 46, 165-172.
51. Díez N (2010). Ecografía en gastroenterología. En *Gastroenterología en animales de compañía*. *Canis et felis* 102: 9-104.
52. Dobson JM, Blackwood LB, McInnes EF et al. (2001) Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J Small Anim Pract* 42, 377-384.

53. Dorn CR, Taylor DO, Frye FL et al. (1968a) Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. I. Methodology and description of cases. *J Natl Cancer Inst* 40, 295-305.
54. Dorn CR, Taylor DO, Schneider R et al. (1968b) Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst* 40, 307-318.
55. Dunn JK (1999). Anorexia and ptyphagia. En Dunn, J.K (ed.). *Textbook of small animal medicine*. Ed. W.B. Saunders. London, 13-17.
56. Elwood CM (1999). Diarrhoea. En Dunn, J.K. (ed). *Textbook of small animal medicine*. Ed. W.B. Saunders. London, 58-65.
57. Evans S, Bonczynski J, Broussard J et al. (2006) Comparison of endoscopic and full-thickness biopsy specimens for diagnosis of inflammatory bowel disease and alimentary tract lymphoma in cats. *J Am Vet Med Assoc* 229, 1447-1450.
58. Everitt BS (1992) *The Analysis of Contingency Tables*. Chapman & Hall. Second Edition.
59. Fell JM, Walker-Smith JA, Spencer J et al. (1996) The distribution of dividing T cells throughout the intestinal wall in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 104, 280-285.
60. Ferrán Aranaz M (1996) *SPSS para Windows. Programación y Análisis Estadístico*. Mc Graw Hill.
61. Flood-Knapik KE, Durham AC, Gregor TP et al. (2012) Clinical, histopathological and immunohistochemical characterization of canine indolent lymphoma. *Vet Comp Oncol*.
62. Fournel-Fleury C, Magnol J, Chabanne L et al. (1997a) Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-67 antigen. *J Comp Pathol* 117, 61-72.
63. Fournel-Fleury C, Magnol JP, Bricaire P et al. (1997b) Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *J Comp Pathol* 117, 35-59.
64. Fournel-Fleury C, Ponce F, Felman P et al. (2002) Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Vet Pathol* 39, 92-109.
65. Frank JD, Reimer SB, Kass PH et al. (2007) Clinical outcomes of 30 cases (1997-2004) of canine gastrointestinal lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 43, 313-321.
66. French RA, Seitz SE, Valli VE (1996) Primary epitheliotropic alimentary T-cell lymphoma with hepatic involvement in a dog. *Vet Pathol* 33, 349-352.
67. Frost D, Lasota J, Miettinen M (2003) Gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas in the dog: a histopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 50 cases. *Vet Pathol* 40, 42-54.
68. Fukushima K, Ohno K, Koshino-Goto Y et al. (2009) Sensitivity for the detection of a clonally rearranged antigen receptor gene in endoscopically obtained biopsy specimens from canine alimentary lymphoma. *J Vet Med Sci* 71, 1673-1676.
69. Gamlem H, Nordstoga K, Glatte E (2008) Canine neoplasia--introductory paper. *APMIS Suppl*, 5-18.

70. García MI, García-Sancho M (2010). Radiología del aparato digestivo. En Gastroenterología en animales de compañía. *Canis et felis* 102: 72-88.
71. García-Sancho M, Rodríguez-Franco F, Sainz A et al. (2007) Evaluation of clinical, macroscopic, and histopathologic response to treatment in nonhypoproteinemic dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis. *J Vet Intern Med* 21, 11-17.
72. García-Sancho M, Sainz A, Villaescusa A et al. (2011) White spots on the mucosal surface of the duodenum in dogs with lymphocytic plasmacytic enteritis. *J Vet Sci* 12, 165-169.
73. Gaschen L (2011) Ultrasonography of small intestinal inflammatory and neoplastic diseases in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 41, 329-344.
74. Gaschen L, Kircher P, Stüssi A et al. (2008) Comparison of ultrasonographic findings with clinical activity index (CIBDAI) and diagnosis in dogs with chronic enteropathies. *Vet Radiol Ultrasound* 49, 56-64.
75. Gascoyne RD, Müller-Hermelink HK, Chott A et al. (2000) Tumours of the small intestine: B-cell lymphoma, T-cell lymphoma. In: World Health Organization Classification of Tumours: Tumours of the Digestive System. (1 edn). S.R. H & L.A. A (eds). IARC Press, Lyon. pp. 69-91.
76. Gavazza A, Lubas G, Valori E et al. (2008) Retrospective survey of malignant lymphoma cases in the dog: clinical, therapeutical and prognostic features. *Vet Res Commun* 32 Suppl 1, S291-293.
77. Gentilini F, Calzolari C, Turba ME et al. (2009) GeneScanning analysis of Ig/TCR gene rearrangements to detect clonality in canine lymphomas. *Vet Immunol Immunopathol* 127, 47-56.
78. Gerard-Marchant R, Hamlin I, Lennert K et al (1974). Classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet* ii: 406-408.
79. Gerdes J, Lemke H, Baisch H et al. (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133, 1710-1715.
80. German AJ (2005). Diseases of the small intestine. En Hall, Simpsom & Williams (Ed). *BSAVA Manual of Canine and Feline Gastroenterology*, 2ª ed (pp 176-202). Gloucester, England: BSAVA.
81. German A, Hall E, Day M (2001) Immune cell populations within the duodenal mucosa of dogs with enteropathies. *J Vet Intern Med* 15, 14-25.
82. German AJ, Hall EJ, Day MJ (1999) Analysis of leucocyte subsets in the canine intestine. *J Comp Pathol* 120, 129-145.
83. Giaginis C, Giagini A, Tsourouflis G et al. (2011) MCM-2 and MCM-5 expression in gastric adenocarcinoma: clinical significance and comparison with Ki-67 proliferative marker. *Dig Dis Sci* 56, 777-785.
84. Gieger T (2011) Alimentary lymphoma in cats and dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 41, 419-432.
85. Goggin JM, Biller DS, Debey BM et al (2000). Ustrasonographic measurements of gastrointestinal wall thickness and the ultrasonographic appearance of the ileocolic region in healthy cats. *J Am Anim Hosp Assoc*, 36: 224-228.

86. Greenlee PG, Filippa DA, Quimby FW et al. (1990) Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer* 66, 480-490.
87. Guija de Arespacochaga A, Schwendenwein I, Weissenböck H (2007) Retrospective study of 82 cases of canine lymphoma in Austria based on the Working Formulation and immunophenotyping. *J Comp Pathol* 136, 186-192.
88. Guilford WG (1996) Inflammatory bowel diseases. En: Strombeck DR (ed.): *Strombeck's small animal gastroenterology*. Ed. WB Saunders Company (3ª ed). Philadelphia, pp. 451-486.
89. Guilford WG, Strombeck DR (1996) Neoplasms of the gastrointestinal tract, APUD tumors, endocrinopathies and the gastrointestinal tract. En: Strombeck DR (ed): *Strombeck's Small Animal Gastroenterology*. Ed. WB Saunders Company (3ª ed). Philadelphia. pp. 519-531.
90. Guvenc T, Haligur M, Orman MN et al. (2002) Mitosis and apoptosis in canine cutaneous histiocytoma and transmissible venereal tumour. *Acta Vet Hung* 50, 315-321.
91. Haapasalo H, Pesonen E, Collan Y (1989) Volume corrected mitotic index (M/V-INDEX). The standard of mitotic activity in neoplasms. *Pathol Res Pract* 185, 551-554.
92. Hadzi-Pecova L, Petrusevska G, Stojanovic A (2007) Non-Hodgkin's lymphomas: immunologic prognostic studies. *Prilozi* 28, 39-55.
93. Hahn KA, Richardson RC, Hahn EA et al. (1994) Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma. *Vet Pathol* 31, 528-540.
94. Hall EJ, German AJ (2007) Enfermedades del intestino delgado. En Ettinger & Feldman (Ed), *Tratado de Medicina interna veterinaria*. Ed. Elsevier Saunders (6ªed). Madrid, pp. 1332-1378.
95. Hall PA, Richards MA, Gregory WM et al. (1988) The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* 154, 223-235.
96. Hamilton SR, Aaltonen LA (2000) *WHO Classification of Tumours of the digestive system* (4th ed). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
97. Harris NL (2001) Mature B-cell neoplasms: introduction. En: *Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, ed. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, and Vardiman JW. IARC Press, Lyon, France, pp., 121-126.
98. Harris NL (1997) Principles of the revised European-American Lymphoma Classification (from the International Lymphoma Study Group). *Ann Oncol* 8 Suppl 2, 11-16.
99. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. (1999) The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 10, 1419-1432.
100. Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1361-1392.
101. Hayes J, Dunn E (1989) Has the incidence of primary gastric lymphoma increased? *Cancer* 63, 2073-2076.

102. Head KW, Cullen JM, Dubielzig RR et al (2003). Definitions and exploratory notes. En WHO Histological Classification of Tumors of the Alimentary System of Domestic Animals. 2ªed. Washington, USA: Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology, pp. 73-110.
103. Jacobs G, Collins-Kelly L, Lappin M et al. (1990) Lymphocytic-plasmacytic enteritis in 24 dogs. *J Vet Intern Med* 4, 45-53.
104. Jacobs RB, Messick JB, Valli VE (2002). Tumors of the skin and hemolymphatic system. En Meuten, D.J. (ed): Tumors in domestic animals. Iowa, USA: Blackwell Publishing, pp. 45-118.
105. Jaffe ES (2009) The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 523-531.
106. Jaffe ES, Braylan RC, Nanba K et al. (1977) Functional markers: a new perspective on malignant lymphomas. *Cancer Treat Rep* 61, 953-962.
107. Jaffe ES, Harris NL, Stein H et al. (2008) Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood* 112, 4384-4399.
108. Jeon S, Lee MJ, Park J et al. (2007) Fast molecular diagnostics of canine T-cell lymphoma by PCR and capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence detector. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 854, 268-272.
109. Jergens AE, Moore FM, Haynes JS et al. (1992) Idiopathic inflammatory bowel disease in dogs and cats: 84 cases (1987-1990). *J Am Vet Med Assoc* 201, 1603-1608.
110. Jergens AE, Schreiner CA, Frank DE et al. (2003) A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. *J Vet Intern Med* 17, 291-297.
111. Jergens AE, Simpson KW (2012) Inflammatory bowel disease in veterinary medicine. *Front Biosci (Elite Ed)* 4, 1404-1419.
112. Jubala CM, Wojcieszyn JW, Valli VE et al. (2005) CD20 expression in normal canine B cells and in canine non-Hodgkin lymphoma. *Vet Pathol* 42, 468-476.
113. Kamstock DA, Ehrhart EJ, Getzy DM et al. (2011) Recommended guidelines for submission, trimming, margin evaluation, and reporting of tumor biopsy specimens in veterinary surgical pathology. *Vet Pathol* 48, 19-31.
114. Kaneene JB, Miller R (1999) Re-analysis of 2,4-D use and the occurrence of canine malignant lymphoma. *Vet Hum Toxicol* 41, 164-170.
115. Kaneko N, Yamamoto Y, Wada Y et al. (2009) Application of polymerase chain reaction to analysis of antigen receptor rearrangements to support endoscopic diagnosis of canine alimentary lymphoma. *J Vet Med Sci* 71, 555-559.
116. Kano R, Inoue C, Okano H et al. (2005) Canine CD20 gene. *Vet Immunol Immunopathol* 108, 265-268.
117. Kelleher L, Magee HM, Dervan PA (1994) Evaluation of cell-proliferation antibodies reactive in paraffin sections. *Appl Immunohistochem*, 2: 164-170.
118. Keller ET, MacEwen EG, Rosenthal RC et al. (1993) Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *J Vet Intern Med* 7, 289-295.

119. Keller RL, Avery AC, Burnett RC et al. (2004) Detection of neoplastic lymphocytes in peripheral blood of dogs with lymphoma by polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement. *Vet Clin Pathol* 33, 145-149.
120. Kim SJ, Choi CW, Mun YC et al. (2011) Multicenter retrospective analysis of 581 patients with primary intestinal non-hodgkin lymphoma from the Consortium for Improving Survival of Lymphoma (CISL). *BMC Cancer* 11, 321.
121. Kiupel M, Smedley RC, Pfent C et al. (2011) Diagnostic algorithm to differentiate lymphoma from inflammation in feline small intestinal biopsy samples. *Vet Pathol* 48, 212-222.
122. Kiupel M, Teske E, Bostock D (1999) Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol* 36, 292-300.
123. Kleinschmidt S, Harder J, Nolte I et al. (2010) Chronic inflammatory and non-inflammatory diseases of the gastrointestinal tract in cats: diagnostic advantages of full-thickness intestinal and extraintestinal biopsies. *J Feline Med Surg* 12, 97-103.
124. Kleinschmidt S, Meneses F, Nolte I et al. (2006) Retrospective study on the diagnostic value of full-thickness biopsies from the stomach and intestines of dogs with chronic gastrointestinal disease symptoms. *Vet Pathol* 43, 1000-1003.
125. Kleinschmidt S, Meneses F, Nolte I et al. (2007) Characterization of mast cell numbers and subtypes in biopsies from the gastrointestinal tract of dogs with lymphocytic-plasmacytic or eosinophilic gastroenterocolitis. *Vet Immunol Immunopathol* 120, 80-92.
126. Koch P, del Valle F, Berdel WE et al. (2001) Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: I. Anatomic and histologic distribution, clinical features, and survival data of 371 patients registered in the German Multicenter Study GIT NHL 01/92. *J Clin Oncol* 19, 3861-3873.
127. Kodama A, Sakai H, Kobayashi K et al. (2008) B-cell intestinal lymphoma with Mott cell differentiation in a 1-year-old miniature Dachshund. *Vet Clin Pathol* 37, 409-415.
128. Kohno S, Ohshima K, Yoneda S et al. (2003) Clinicopathological analysis of 143 primary malignant lymphomas in the small and large intestines based on the new WHO classification. *Histopathology* 43, 135-143.
129. Konde LJ, Green PA, Pugh CR (2003) Radiology and ultrasonography of the digestive system. En Tams, T.R. (Ed.): *Handbook of Small Animal Gastroenterology*. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, pp. 51-96.
130. Krecic MR, Black SS (2000) Epitheliotropic T-cell gastrointestinal tract lymphosarcoma with metastases to lung and skeletal muscle in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 216, 524-529, 517.
131. Krugmann J, Dirnhofer S, Gschwendtner A et al. (2001) Primary gastrointestinal B-cell lymphoma. A clinicopathological and immunohistochemical study of 61 cases with an evaluation of prognostic parameters. *Pathol Res Pract* 197, 385-393.
132. Kusewitt DF (2012) Neoplasia and Tumor Biology. En Zachari, J.F., McGavin, M.D. (eds): *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5ª Ed. Missouri, USA: Elsevier Mosby, pp. 289-321.
133. Labelle P, Kyles AE, Farver TB et al. (2004) Indicators of malignancy of canine adrenocortical tumors: histopathology and proliferation index. *Vet Pathol* 41, 490-497.
134. Lana SE, Jackson TL, Burnett RC et al. (2006) Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 20, 329-334.

135. Laprie C, Abadie J, Amardeilh MF et al. (2001) MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. *Vet Dermatol* 12, 139-147.
136. Laprie C, Abadie J, Amardeilh MF et al. (1998) Detection of the Ki-67 proliferation associated nuclear epitope in normal canine tissues using the monoclonal antibody MIB-1. *Anat Histol Embryol* 27, 251-256.
137. Lazăr D, Tăban S, Sporea I et al. (2010) Ki-67 expression in gastric cancer. Results from a prospective study with long-term follow-up. *Rom J Morphol Embryol* 51, 655-661.
138. Lee CH, Kim WH, Lim JH et al. (2004) Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *J Vet Sci* 5, 63-69.
139. Lee JJ, Hughes CS, Fine RL et al. (1996) P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer* 77, 1892-1898.
140. Leibman NF, Larson VS, Ogilvie, G.K. (2003) Oncologic diseases of the digestive system. In: Tams, TR: *Handbook of small animal gastroenterology*. (2 edn). Company WBS (ed), Philadelphia. pp. 370-415.
141. Lennert K (1978) *Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease*. New York: Springer-Verlag.
142. Lennert K (1975a) Morphology and classification of malignant lymphomas and so-called reticuloses. *Acta Neuropathol Suppl* 6, 1-16.
143. Lennert K (1975b) [Pathology in Kiel (1949-1975)]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 59, XXIII-XXVII.
144. Lennert K (1992) [Non-Hodgkin's lymphomas: principles and application of the Kiel classification]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 76, 1-13.
145. Lewis JD, Bilker WB, Brensinger C et al. (2001) Inflammatory bowel disease is not associated with an increased risk of lymphoma. *Gastroenterology* 121, 1080-1087.
146. Li YZ, Zhao P (2009) [Expressions of cyclinB1, FHIT and Ki-67 in 336 gastric carcinoma patients and their clinicopathologic significance]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 89, 2337-2341.
147. Lingard AE, Briscoe K, Beatty JA et al. (2009) Low-grade alimentary lymphoma: clinicopathological findings and response to treatment in 17 cases. *J Feline Med Surg* 11, 692-700.
148. Lowe AD (2004) Alimentary lymphosarcoma in a 4-year-old Labrador retriever. *Can Vet J* 45, 610-612.
149. Lukande R, Wabinga H, Tumwine L (2008) Burkitt's lymphoma in Uganda: the role of immunohistochemistry in diagnosis. *East Afr Med J* 85, 207-212.
150. Lukes RJ, Collins RD (1974) Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 34, suppl:1488-1503.
151. Lurie DM, Milner RJ, Suter SE et al. (2008) Immunophenotypic and cytomorphic subclassification of T-cell lymphoma in the boxer breed. *Vet Immunol Immunopathol* 125, 102-110.
152. MacEwen EG, Young KM (1996) Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: Withrow SJ, MacEwen EG, eds. *Small animal clinical oncology*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, pp. 451-479.

153. MacVean DW, Monlux AW, Anderson PS et al. (1978) Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Vet Pathol* 15, 700-715.
154. Madewell BR (1985) Canine lymphoma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 15, 709-722.
155. Mansell J, Willard MD (2003) Biopsy of the gastrointestinal tract. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33, 1099-1116.
156. Marks SL (1998). Management of Inflammatory Bowel Disease. *Compendium on Continuing Education For The Practicing Veterinaria*, 20: 317-331.
157. Martin B, Paesmans M, Mascaux C et al. (2004) Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 91, 2018-2025.
158. Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C et al. (2008) Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med* 22, 976-984.
159. Millanta F, Fratini F, Corazza M et al. (2002) Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behaviour. *Res Vet Sci* 73, 45-51.
160. Miller AG, Morley PS, Rao S et al. (2009) Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 23, 116-122.
161. Milner RJ, Pearson J, Nesbit JW et al. (1996) Immunophenotypic classification of canine malignant lymphoma on formalin-mixed paraffin wax-embedded tissue by means of CD3 and CD79a cell markers. *Onderstepoort J Vet Res* 63, 309-313.
162. Miura T, Maruyama H, Sakai M et al. (2004) Endoscopic findings on alimentary lymphoma in 7 dogs. *J Vet Med Sci* 66, 577-580.
163. Moore AS, Leveille CR, Reimann KA et al. (1995) The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance. *Cancer Invest* 13, 475-479.
164. Moore MP, Kinne DW (1995) The surgical management of primary invasive breast cancer. *CA Cancer J Clin* 45, 279-288.
165. Moore PF, Rodriguez-Bertos A, Kass PH (2012) Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype, and molecular clonality. *Vet Pathol* 49, 658-668.
166. Moore PF, Vernau W (2000) Lymphocytes: differentiation molecules in diagnosis and prognosis. *In: Schalm's Veterinary Hematology*, ed. Feldman BF, Zinkl JG, and Jain NC, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 247-255.
167. Moore PF, Woo JC, Vernau W et al. (2005) Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol* 106, 167-178.
168. Morrison-Collister KE, Rassnick KM, Northrup NC et al. (2003) A combination chemotherapy protocol with MOPP and CCNU consolidation (Tufts VELCAP-SC) for the treatment of canine lymphoma. *Vet Comp Oncol* 1, 180-190.
169. Mukaratirwa S (2005) Prognostic and predictive markers in canine tumours: rationale and relevance. A review. *Vet Q* 27, 52-64.
170. Mukaratirwa S, Gruys E, Nederbragt H (2004) Relationship between cell proliferation and tenascin-C expression in canine gastrointestinal tumours and normal mucosa. *Res Vet Sci* 76, 133-138.

171. Murray GI, Paterson PJ, Weaver RJ et al. (1993) The expression of cytochrome P-450, epoxide hydrolase, and glutathione S-transferase in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 71, 36-43.
172. Murray JF, Enarson DA (1992) World lung health: a concept that should become a reality. The ATS Committee on World Lung Health. *Am Rev Respir Dis* 146, 818-822.
173. Münster M, Hörauf A, Bilzer T (2006) [Assessment of disease severity and outcome of dietary, antibiotic, and immunosuppressive interventions by use of the canine IBD activity index in 21 dogs with chronic inflammatory bowel disease]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 119, 493-505.
174. National Cancer Institute (1982). The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project: National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: Summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 49, 2112-2135.
175. Nemec A, Zavodovskaya R, Affolter VK et al. (2012). Erythema multiforme and epitheliotropic T-cell lymphoma in the oral cavity of dogs: 1989-2009. *J Small Anim Pract.* 2012 Aug;53(8):445-52.
176. Neumann S, Kaup FJ (2005) Usefulness of Ki-67 proliferation marker in the cytologic identification of liver tumors in dogs. *Vet Clin Pathol* 34, 132-136.
177. Newell SM, Graham JP, Roberts GD et al (1999). Sonography of the normal feline gastrointestinal tract. *Vet Radiol Ultrasound*, 40:40-43.
178. Nieto A, Peña L, Pérez-Alenza MD et al. (2000) Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 37, 239-247.
179. Nyman HT, Kristensen AT, Flagstad A et al. (2004) A review of the sonographic assessment of tumor metastases in liver and superficial lymph nodes. *Vet Radiol Ultrasound* 45, 438-448.
180. Ogilvie GK, Moore AS (1995) Paraneoplastic síndromes. In: *Managing the veterinary cancer patient*. Trenton: Veterinary Learning Systems, 197-222.
181. Olivero D, Turba ME, Gentilini F (2011). Reduced diversity of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in chronic inflammatory gastrointestinal diseases in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 144, 337-345.
182. Ozaki K, Yamagami T, Nomura K et al. (2006) T-cell lymphoma with eosinophilic infiltration involving the intestinal tract in 11 dogs. *Vet Pathol* 43, 339-344.
183. Papermaster BW, Good RA (1962) Relative contributions of the thymus and the bursa of Fabricius to the maturation of the lymphoreticur system and immunological potential in the chicken. *Nature* 196, 838-840.
184. Pastor M, Chalvet-Monfray K, Marchal T et al. (2009) Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *J Vet Intern Med* 23, 301-310.
185. Patnaik AK, Hurvitz AI, Johnson GF (1977) Canine gastrointestinal neoplasms. *Vet Pathol* 14, 547-555.
186. Penninck D (2008) Gastrointestinal Tract. En Penninck D., D'Anjou M.A. (eds). *Atlas of Small Animal Ultrasonography*. Blackwell Publishing.

187. Penninck D, Smyers B, Webster CR et al. (2003) Diagnostic value of ultrasonography in differentiating enteritis from intestinal neoplasia in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 44, 570-575.
188. Penninck DG (1998) Characterization of gastrointestinal tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 28, 777-797.
189. Perona R (1998) Ciclo celular y genes relacionados. *Oncología*, 21: 32-34.
190. Peterson PB, Willard MD (2003) Protein-losing enteropathies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33, 1061-1082.
191. Peña LL, Nieto AI, Pérez-Alenza D et al. (1998) Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest* 10, 237-246.
192. Phillips BS, Kass PH, Naydan DK et al. (2000) Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J Vet Diagn Invest* 12, 111-117.
193. Pohlman LM, Higginbotham ML, Welles EG et al. (2009) Immunophenotypic and histologic classification of 50 cases of feline gastrointestinal lymphoma. *Vet Pathol* 46, 259-268.
194. Ponce F, Magnol JP, Ledieu D et al. (2004) Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet J* 167, 158-166.
195. Ponce F, Magnol JP, Marchal T et al. (2003) High-grade canine T-cell lymphoma/leukemia with plasmacytoid morphology: a clinical pathological study of nine cases. *J Vet Diagn Invest* 15, 330-337.
196. Ponce F, Marchal T, Magnol JP et al. (2010) A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet Pathol* 47, 414-433.
197. Price GS, Page RL, Fischer BM et al. (1991) Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *J Vet Intern Med* 5, 259-262.
198. Radić-Kristo D, Planinc-Peraica A, Ostojić S et al. (2010) Primary gastrointestinal non-Hodgkin lymphoma in adults: clinicopathologic and survival characteristics. *Coll Antropol* 34, 413-417.
199. Ragaini L, Aste G, Cavicchioli L et al. (2003) Inflammatory bowel disease mimicking alimentary lymphosarcoma in a cat. *Vet Res Commun* 27 Suppl 1, 791-793.
200. Ramos-Vara J, Miller M, Valli V (2007) Immunohistochemical detection of multiple myeloma 1/interferon regulatory factor 4 (MUM1/IRF-4) in canine plasmacytoma: comparison with CD79a and CD20. *Vet Pathol* 44, 875-884.
201. Rappaport H (1966) Tumors of the hematopoietic system. In: *Atlas of Tumor Pathology, Section III*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC.
202. Rassnick KM, Moore AS, Collister KE et al. (2009) Efficacy of combination chemotherapy for treatment of gastrointestinal lymphoma in dogs. *J Vet Intern Med* 23, 317-322.
203. Reif JS, Lower KS, Ogilvie GK (1995) Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma. *Am J Epidemiol* 141, 352-359.
204. Richter KP (2003) Feline gastrointestinal lymphoma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33, 1083-1098, vii.

205. Ridell RH, Petras RE, Williams GT et al (2003) Lymphoproliferative disorders of the intestines. En Tumors of the Intestines. Atlas of tumor pathology. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, pp. 395-424.
206. Riedesel EA (2007) The small bowel. En Thrall D.E.(Ed): Textbook of veterinary diagnostic radiology. Philadelphia: Saunders Elsevier, pp. 770-791.
207. Rivas C, Echezarreta G, García R et al. (1992) A multiparametric study of malignant lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT). *Leuk Lymphoma* 8, 87-96.
208. Rodríguez-Franco F, Carrasco V (2010) Neoplasias gastrointestinales en el perro. En *Gastroenterología en animales de compañía*. *Canis et felis* 102: 58-72.
209. Rodríguez-Franco F, García-Sancho M, Mancho C et al (2004). Índice de actividad para la enfermedad inflamatoria crónica intestinal del intestino delgado del perro. *Pequeños animales*, 53: 39-48.
210. Rodríguez-Franco F, Rodríguez-Bertos A, Rodríguez-Castaño A (2002) Histopathological study in a hundred dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis (LPE). Proceeding del 27th World Small Animal Veterinary Congress (WSAVA). Granada, 202.
211. Rodríguez-Franco F, Rodríguez-Bertos A, Rodríguez-Castaño A et al (1999) Endoscopic and histopathological study in twenty dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis (LPE). Proceeding del 24th World Small Animal Veterinary Congress (W.S.A.V.A). Lyon.
212. Rosenberg SA, Kaplan HS (1975) Clinical trials in the non-Hodgkin's lymphomata at Stanford University experimental design and preliminary results. *Br J Cancer Suppl* 2, 456-464.
213. Roth L, Leib M, Davenport D et al. (1990) Comparisons between endoscopic and histologic evaluation of the gastrointestinal tract in dogs and cats: 75 cases (1984-1987). *J Am Vet Med Assoc* 196, 635-638.
214. Rudolf H, van Schaik G, O'Brien RT et al. (2005) Ultrasonographic evaluation of the thickness of the small intestinal wall in dogs with inflammatory bowel disease. *J Small Anim Pract* 46, 322-326.
215. Ruslander DA, Gebhard DH, Tompkins MB et al. (1997) Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo* 11, 169-172.
216. Safran N, Perk K, Eyal O et al. (1992) Isolation and preliminary characterisation of a novel retrovirus isolated from a leukaemic dog. *Res Vet Sci* 52, 250-255.
217. Sako T, Uchida E, Okamoto M et al. (2003) Immunohistochemical evaluation of a malignant intestinal carcinoid in a dog. *Vet Pathol* 40, 212-215.
218. Samuel S, Milstein H, Dobson JM et al (1999) An epidemiological study into the incidence of neoplasia in a population of insured dogs in the UK. En *Proceedings of the British Small Animal Veterinary Association Congress*. Birmingham, Reino Unido.
219. Sapieryński R (2010) Practical aspects of immunocytochemistry in canine lymphomas. *Pol J Vet Sci* 13, 661-668.
220. Sapieryński R, Micuń J, Jagielski D et al. (2010) Cytopathology of canine lymphomas (100 cases). *Pol J Vet Sci* 13, 653-659.
221. Sarli G, Benazzi C, Preziosi R et al. (1994) Proliferative activity assessed by anti-PCNA and Ki67 monoclonal antibodies in canine testicular tumours. *J Comp Pathol* 110, 357-368.

222. Sarli G, Preziosi R, Benazzi C et al. (2002) Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *J Vet Diagn Invest* 14, 25-34.
223. Schafer KA (1998) The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 35, 461-478.
224. Scott KD, Zoran DL, Mansell J et al. (2011) Utility of endoscopic biopsies of the duodenum and ileum for diagnosis of inflammatory bowel disease and small cell lymphoma in cats. *J Vet Intern Med* 25, 1253-1257.
225. Searcey GP (2001) The hemopoietic system. En Thomson's (Ed) *Special Veterinary Pathology*, 3^aed. Missouri, USA: Mosby, pp. 325-381.
226. Sharaiha RZ, Lebwohl B, Reimers L et al. (2011) Increasing incidence of enteropathy-associated T-cell lymphoma in the United States, 1973-2008. *Cancer*.
227. Shevach EM, Jaffe ES, Green I (1973) Receptors for complement and immunoglobulin on human and animal lymphoid cells. *Transplant Rev* 16, 3-28.
228. Simpson KW, Jergens AE (2011). Pitfalls and progress in the diagnosis and management of canine inflammatory bowel disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 41, 339-418.
229. Sokołowska J, Cywińska A, Malicka E (2005) p53 expression in canine lymphoma. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 52, 172-175.
230. Sonea IM, Jergens AE, Sacco RE et al. (2000) Flow cytometric analysis of colonic and small intestinal mucosal lymphocytes obtained by endoscopic biopsy in the healthy dog. *Vet Immunol Immunopathol* 77, 103-119.
231. SPSS (2010) *SPSS Statistics 19.0 Command Syntax Reference*. SPSS Inc.
232. Steinberg H, Dubielzig RR, Thomson J et al. (1995) Primary gastrointestinal lymphosarcoma with epitheliotropism in three Shar-pei and one boxer dog. *Vet Pathol* 32, 423-426.
233. Stonehewer J, Simpson J, Else R et al. (1998) Evaluation of B and T lymphocytes and plasma cells in colonic mucosa from healthy dogs and from dogs with inflammatory bowel disease. *Res Vet Sci* 65, 59-63.
234. Strande A, Sommers SC, Petrak M (1954) Regional enterocolitis in cocker spaniel dogs. *AMA Arch Pathol* 57, 357-362.
235. Stricker TP, Kumar V (2010) Neoplasia. En Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, M., Aster, J. (eds): *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease*. 8^a ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, pp. 259-330.
236. Sueiro F, Alessi A, Vassallo J Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. *J Comp Pathol* 131, 207-213.
237. Sun J, Lu Z, Yang D et al. (2011) Primary intestinal T-cell and NK-cell lymphomas: a clinicopathological and molecular study from China focused on type II enteropathy-associated T-cell lymphoma and primary intestinal NK-cell lymphoma. *Mod Pathol* 24, 983-992.
238. Swerdlow SH, Campo E, Harris N L et al (2008) (Eds) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (4th ed). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer

239. Sözmen M, Tasca S, Carli E et al. (2005) Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. *J Vet Diagn Invest* 17, 323-330.
240. Takanosu M, Tadika T, Kobayashi T (2010) Heteroduplex polymerase chain reaction is essential for canine receptor rearrangement analysis. *J Vet Diagn Invest* 22, 760-763.
241. Tams TR (1992) Canine and feline inflammatory bowel disease. *California Veterinarian*, 46: 21-24.
242. Tams TR (2003) Chronic Diseases of the Small Intestine. En Tams, T.R. (Ed.): *Handbook of Small Animal Gastroenterology*. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, pp. 211-250.
243. Tams TR (2003) Endoscopy and Laparoscopy in Veterinary Gastroenterology. En Tams, T.R. (Ed.): *Handbook of Small Animal Gastroenterology*. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, pp. 97-117.
244. Tamura K, Yagihara H, Isotani M et al. (2006) Development of the polymerase chain reaction assay based on the canine genome database for detection of monoclonality in B cell lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol* 110, 163-167.
245. Teske E (1994) Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet Q* 16, 209-219.
246. Teske E, van Heerde P, Rutteman GR et al. (1994) Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 205, 1722-1728.
247. Teske E, Wisman P, Moore PF et al (1974). Histological classification and immunohistochemistry of canine non-Hodgkin's lymphomas. Unexpected high frequency of T-cell lymphomas with B-cell morphology. En Jarrett & Mackey, *Non-Hodgkin's lymphoma in the dog: characterization and experimental therapy*, pp. 19-35.
248. Teske E, Wisman P, Moore PF et al. (1994) Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. *Exp Hematol* 22, 1179-1187.
249. The non-Hodgkin's lymphoma Classification Project (1997). A clinical evaluation of the International lymphoma study group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 89, 3909-3918.
250. Tizard IR (2009) Lymphocytes, in *Veterinary Immunology*, ed. I.R. Tizard, Eighth ed, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 128-138.
251. Turner JR (2010) The Gastrointestinal Tract. En Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, M., Aster, J. (eds): *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease*. 8ª ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, pp. 763-833.
252. Vail DM, MacEwen EG, Young KM (2001). Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: Withrow SJ, MacEwen EG, eds. *Small Animal Clinical Oncology*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 684-718.
253. Vail D, Thamm DH (2007) Tumores hematopoyéticos. En Ettinger & Feldman (Ed), *Tratado de Medicina interna veterinaria*, 6ªed. Madrid, España: Elsevier Saunders, pp. 732-747.
254. Valli VE, Jacobs RM, Parodi AL et al (2002) Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals. En World Health Organization. *International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, Second Series, Vol. 8*. Washington, USA: Armed Forces Institute of Pathology.

255. Valli VE (2007). Hematopoietic system. En Jubb, Kennedy & Palmer's (Ed). Pathology of domestic animals, 5ª ed. Philadelphia, USA: Elsevier, pp. 150-210.
256. Valli VE (2007). T-Cell and NK neoplasms. En Veterinary Comparative Hematopathology. 1ªEd. Oxford, UK: Blackwell Publishing, pp. 275-365.
257. Valli VE, San Myint M, Barthel A et al. (2011) Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. Vet Pathol 48, 198-211.
258. Valli VE, Vernau W, de Lorimier LP et al. (2006) Canine indolent nodular lymphoma. Vet Pathol 43, 241-256.
259. Van den Steen N, Berlato D, Polton G et al. (2012) Rectal lymphoma in 11 dogs - a retrospective study. J Small Anim Pract.
260. van der Gaag I, Happé RP (1990) Follow-up studies by peroral small intestinal biopsies and necropsy in dogs with chronic diarrhea. Zentralbl Veterinarmed A 37, 561-568.
261. van Krieken JH, Langerak AW, Macintyre EA et al. (2007) Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. Leukemia 21, 201-206.
262. Van Unnik JA, Breur K, Burgers JM et al. (1975) Non-Hodgkin's lymphomata: clinical features in relation to histology. Br J Cancer Suppl 2, 201-207.
263. Vaux DL, Korsmeyer SJ (1999) Cell death in development. Cell 96, 245-254.
264. Vernau W, Moore PF (1999) An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. Vet Immunol Immunopathol 69, 145-164.
265. Vezzali E, Parodi AL, Marcato PS et al. (2010) Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. Vet Comp Oncol 8, 38-49.
266. Vonderhaar MA, Morrison WB (1998) Lymphosarcoma. En Wallace B. Morrison (ed). Cancer in dogs and cats: medical and surgical management, 1ªed. Maryland, USA: Williams & Wilkins, pp. 667-697.
267. Waly N, Gruffydd-Jones T, Stokes C et al. (2005) Immunohistochemical diagnosis of alimentary lymphomas and severe intestinal inflammation in cats. J Comp Pathol 133, 253-260.
268. Waly N, Gruffydd-Jones TJ, Stokes CR et al. (2001) The distribution of leucocyte subsets in the small intestine of healthy cats. J Comp Pathol 124, 172-182.
269. Washabau RJ, Day MJ, Willard MD et al. (2010) Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. J Vet Intern Med 24, 10-26.
270. Wasmer ML, Willard MD, Helman RG et al. (1995) Food intolerance mimicking alimentary lymphosarcoma. J Am Anim Hosp Assoc 31, 463-466.
271. Weinberg RA (1996) How cancer arises. Sci Am 275, 62-70.
272. Werner JA, Woo JC, Vernau W et al. (2005) Characterization of feline immunoglobulin heavy chain variable region genes for the molecular diagnosis of B-cell neoplasia. Vet Pathol 42, 596-607.

273. Wilcock B (1992) Endoscopic biopsy interpretation in canine or feline enterocolitis. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 7, 162-171.
274. Wilkerson MJ, Dolce K, Koopman T et al. (2005) Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet Immunol Immunopathol* 106, 179-196.
275. Willard MD (2003) Disorders of the Intestinal Tract. En Nelson R.W. y Couto, C.G. (eds): *Small Animal Internal Medicine*. Philadelphia, Ed Mosby (3ª Ed), pp. 431-465.
276. Willard M (2010) Enfermedad inflamatoria crónica intestinal. En *Gastroenterología en animales de compañía*. *Canis et felis* 102, 32-45.
277. Willard M, Jergens A, Duncan R et al. (2002) Interobserver variation among histopathologic evaluations of intestinal tissues from dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 220, 1177-1182.
278. Willard M, Lovering S, Cohen N et al. (2001) Quality of tissue specimens obtained endoscopically from the duodenum of dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 219, 474-479.
279. Willard MD, Helman G, Fradkin JM et al. (2000) Intestinal crypt lesions associated with protein-losing enteropathy in the dog. *J Vet Intern Med* 14, 298-307.
280. Willard MD, Mansell J, Fosgate GT et al. (2008) Effect of sample quality on the sensitivity of endoscopic biopsy for detecting gastric and duodenal lesions in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 22, 1084-1089.
281. Willard MD, Moore GE, Denton BD et al. (2010) Effect of tissue processing on assessment of endoscopic intestinal biopsies in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 24, 84-89.
282. Williams DA (1996) Malabsorption, Small Intestinal Bacterial Overgrowth, and Protein-Losing Enteropathy. En: Strombeck, D.R. (ed.): *Strombeck's Small Animal Gastroenterology*. ED. W.B. Saunders Compay (3ªEd). Philadelphia, pp. 367-380.
283. Yagihara H, Tamura K, Isotani M et al. (2007) Genomic organization of the T-cell receptor gamma gene and PCR detection of its clonal rearrangement in canine T-cell lymphoma/leukemia. *Vet Immunol Immunopathol* 115, 375-382.
284. Yamasaki K, Suematsu H, Takahashi T (1996) Comparison of gastric and duodenal lesions in dogs and cats with and without lymphocytic-plasmacytic enteritis. *J Am Vet Med Assoc* 209, 95-97.
285. Yamazaki J, Baba K, Goto-Koshino Y et al. (2008) Quantitative assessment of minimal residual disease (MRD) in canine lymphoma by using real-time polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 126, 321-331.
286. Yang D, Bai CM, Xiao Y et al. (2004) [Clinicopathological analysis of primary intestinal non-Hodgkin's lymphoma: a report of 32 cases]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 33, 445-448.
287. Zacchetti A, van Garderen E, Teske E et al. (2003) Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. *APMIS* 111, 430-438.
288. Zuccari DA, Santana AE, Cury PM et al. (2004) Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Vet Clin Pathol* 33, 23-28.
289. Zwahlen CH, Lucroy MD, Kraegel SA et al. (1998) Results of chemotherapy for cats with alimentary malignant lymphoma: 21 cases (1993-1997). *J Am Vet Med Assoc* 213, 1144-1149.

290. Zwingenberger AL, Marks SL, Baker TW et al. (2010) Ultrasonographic evaluation of the muscularis propria in cats with diffuse small intestinal lymphoma or inflammatory bowel disease. J Vet Intern Med 24, 289-292.

A microscopic image showing a field of cells. The nuclei are stained blue, and the cytoplasm of many cells shows brown staining, likely indicating immunohistochemical positivity. The cells are scattered across the field, with some clusters and some isolated cells.

11 PUBLICACIONES

11.1 ARTÍCULOS

- RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; CARRASCO, V. (2010): **“Neoplasias gastrointestinales en el perro”**. Monografía Gastroenterología en Animales de Compañía. Canis et felis Pp. 58–70. Editorial: Acalanthis Comunicación Y Estrategias, S.L.U..ISBN: 1133-2751.

- RODRÍGUEZ-FRANCO F, GARCÍA-SANCHO M, CARRASCO V, VILLAESCUSA A, SÁINZ A. (2012): **“Enfermedad inflamatoria crónica intestinal con hipoproteinemia y ascitis en el perro: 14 casos clínicos”**. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2012 6 (2): 1-10.



Neoplasias gastrointestinales en el perro

FERNANDO RODRÍGUEZ-FRANCO
VIOLETA CARRASCO

Gastroenterología y Endoscopia.
Departamento de Medicina y Cirugía Animal.
Facultad de Veterinaria.
Universidad Complutense de Madrid.

GASTROENTEROLOGÍA EN ANIMALES DE COMPAÑÍA

Aproximadamente un 5% de los tumores del perro se localizan en el tracto gastrointestinal. Aparecen en perros con edades avanzadas. En lo referente al tipo histológico, el carcinoma es el más frecuente, seguido por el adenoma y el linfoma, siendo las diferentes neoplasias mesenquimatosas los tipos histológicos menos comunes. La sintomatología dependerá de la zona afectada por la neoplasia, y del tipo de tumor; la sintomatología en los tumores esofágicos es de disfagia, regurgitación, sialorrea, anorexia parcial o total y pérdida de peso; los perros con tumores gástricos presentan vómitos crónicos persistentes y progresivos (con sangre digerida) anorexia parcial y adelgazamiento; las neoplasias de intestino delgado provocan una sintomatología de diarrea crónica de intestino delgado y vómitos crónicos, unido a una pérdida de peso progresiva; los signos clínicos asociados con neoplasias colónicas y rectales son fundamentalmente tenesmo, disquecia, hematoquecia y eliminación de moco con las heces. La biopsia y su correspondiente estudio histopatológico es esencial para el diagnóstico de estas neoplasias gastrointestinales.

INTRODUCCIÓN

Los tumores del tubo digestivo constituyen el tercer tipo de neoplasia más frecuente en la especie canina, detrás de los tumores cutáneos (30%) y de los tumores mamarios (40%). Aproximadamente un 5% de los tumores del perro se localizan en el tracto gastrointestinal, y de estos, el 70% se localizan en la cavidad oral, el 20% se presentan en el intestino grueso y el 10% restante afectan al estómago^{1,2}. Los tumores de esófago son de presentación muy poco frecuente; las neoplasias que afectan al intestino delgado tienen una baja incidencia de presentación; no existen datos publicados referentes a la incidencia real de presentación de los tumores de esófago y de intestino delgado.

Estadísticamente, aparecen en perros con edades superiores a 8 años^{1,3}, a pesar de estar descritos casos aislados con edades inferiores (5-6 años). En los últimos años, y gracias al mayor empleo de técnicas de diagnóstico complementario, estas enfermedades son diagnosticadas de forma más precoz y en animales con edades más tempranas.

Las neoplasias epiteliales (adenomas y carcinomas) son las más comunes en el tracto digestivo del perro, representando casi la mitad del total de lesiones (46%)³. El segundo grupo más observado son las neoplasias secundarias (26%), especialmente los linfomas multicéntricos^{3,4}. En lo referente al tipo histológico, el carcinoma es el más frecuente (35%), seguido por el adenoma (27%) y el linfoma (23%), siendo las diferentes neoplasias mesenquimatosas los tipos histológicos menos comunes^{1,5}. Dentro del grupo de tumores mesenquimatosos hay que tener en cuenta un nuevo tipo de neoplasia, el tumor estromal gastrointestinal⁶. En los últimos años este tumor está diagnosticándose dentro de este grupo de neoplasias, y tiene tanta prevalencia como los tumo-

res derivados del músculo liso.

En cuanto a las neoplasias secundarias indicar que, con gran diferencia, el tipo más frecuente que afectaba de manera secundaria al tracto gastrointestinal es el linfoma multicéntrico^{4,5}. En el estómago del perro también podemos encontrar como tumores secundarios el carcinoma de hígado, el carcinoma de páncreas y los hemangiosarcomas. Y en el intestino, fundamentalmente en el intestino delgado, podemos encontrar neoplasias secundarias procedentes de carcinomas de páncreas, hemangiosarcomas y sarcomas indiferenciados¹.

NEOPLASIAS DE ESÓFAGO

Las neoplasias esofágicas son infrecuentes en la especie canina, estando descritos los tumores primarios como el carcinoma, leiomioma, leiomiomasarcoma y tumores estromales^{1,5,6}. En los continentes americano y africano también han sido descritos osteosarcomas y fibrosarcomas esofágicos secundarios a *Spirocerca lupi*, si bien esta patología es infrecuente en Europa^{7, 8, 9}. También han sido descritas neoplasias secundarias como consecuencia de metástasis de otros tumores, fundamentalmente carcinomas de localización primaria en el aparato respiratorio.

Muy frecuentemente, las neoplasias esofágicas primarias se localizan en el tercio posterior del esófago, en la zona cercana al esfínter gastroesofágico. Concretamente, los leiomiomas, leiomiomasarcomas y tumores estromales aparecen casi siempre en esta zona cercana al esfínter gastroesofágico, y en algunas ocasiones comparten localización con la zona del fundus gástrico¹⁰.

Muchos perros con neoplasias primarias de esófago son asintomáticos hasta un curso bastante avanzado de la enfermedad. La sintomatología habitual en los tumores esofágicos es de disfagia, regurgitación, sialorrea, anorexia parcial o



GASTROENTEROLOGÍA EN ANIMALES DE COMPAÑÍA

total y pérdida de peso^{10, 11, 12}. En algunas ocasiones estos animales con neoplasias esofágicas pueden presentar episodios de dolor que coinciden con la ingesta de alimentos^{10, 12}.

El diagnóstico de estos tumores de esófago se realiza mediante técnicas de diagnóstico por la imagen (radiología simple y de contraste, y la exploración endoscópica del esófago, con su correspondiente toma de biopsia) (Figura 1). En algunas ocasiones, fundamentalmente cuando estamos ante neoplasias mesenquimatosas de esófago, la biopsia endoscópica no obtiene buenos resultados, por lo que es necesario la realización de una biopsia por métodos quirúrgicos convencionales^{1, 11}.

El tratamiento de elección en los tumores de esófago es la cirugía, basada fundamentalmente en la exéresis de tumor mediante esofagoectomía parcial¹³. Las posibilidades quirúrgicas (de esofagoectomía parcial) suelen ser muy limitadas, por lo que el pronóstico de estos pacientes con tumores de esófago es malo, y suele calificarse de reservado a grave^{1, 10, 11, 12}.

NEOPLASIAS GÁSTRICAS

Las neoplasias gástricas son relativamente poco frecuentes en el perro. Aparecen estadísticamente en perros con edades superiores a 8 años, por lo que muchos autores las incluyen como enfermedades geriátricas, si bien en los últimos años, y gracias a los medios de diagnóstico por la imagen, son diagnosticadas en estadios más precoces. No se ha encontrado predisposición en cuanto al sexo. Pero numerosos estudios describen predisposición en cuanto a raza; concretamente el carcinoma gástrico es más frecuente en las razas Pastor Belga, Collie y Schnauzer; y los adenomas en las razas Boxer y Bulldog^{14, 15, 16}.



Figura 1. Leiomiosarcoma de esófago. Imagen endoscópica de esófago torácico.

Las neoplasias gástricas tienen etiología desconocida, si bien hay un estudio que apuntan que un daño gástrico crónico de tipo erosivo puede desencadenar la aparición de una neoplasia gástrica (estudio realizado en raza Boxer)¹⁷.

La sintomatología clínica que presentan los animales con tumores gástricos es variada, pero fundamentalmente, estos pacientes presentan vómitos crónicos persistentes y progresivos (con sangre digerida, que suelen ser más o menos intensos, en función del tiempo de enfermedad, tipo de tumor y localización del tumor en el estómago), anorexia parcial y adelgazamiento progresivo. Cuando se localizan en antro pilórico y son de gran tamaño pueden dar una sintomatología de estenosis pilórica, con retardo o anulación del vaciado gástrico, dando lugar a un vómito postprandial que aparece horas después de la ingesta de alimentos^{14, 15, 16, 18, 19, 20}.

La palpación abdominal suele ser muy variable, desde normal hasta dolorosa (y cuando es dolorosa, aparece dolor fundamentalmente en abdomen craneal), siendo raro el poder palpar la "masa gástrica"²⁰.

Habitualmente la hematología y la bioquímica clínica de estos pacientes suelen desprender resultados de normalidad. En algunas ocasiones podemos

Neoplasias gastrointestinales en el perro

encontrar anemia, leucocitosis con neutrofilia, hipoproteinemias y aumentos de urea. Cuando en el análisis de sangre encontramos esta disminución del hematocrito y de las proteínas plasmáticas, unido a un aumento de la urea en sangre, esto nos sugiere la presencia de un sangrado digestivo, probablemente por el tumor gástrico^{14, 15, 16}.

Los estudios radiológicos simples y de contraste pueden ser de utilidad diagnóstica en las neoplasias gástricas. Los signos radiológicos que con mayor frecuencia podemos observar son la distorsión e incluso desaparición del patrón normal de los pliegues, así como una imagen de defecto de llenado más o menos grande e irregular en el estudio radiológico de contraste. Si la neoplasia gástrica es de gran tamaño, y afectan al antro pilórico, pueden producir un retardo o anulación del vaciado gástrico, así como una ausencia de visualización del antro pilórico por defecto de llenado^{21, 22}.

La ultrasonografía también es de ayuda en el diagnóstico de las neoplasias gástricas del perro. A través de ecografía podremos valorar engrosamientos de la pared gástrica, e incluso diferenciar si se trata de un tumor mucoso o de un tumor muscular, en función de la capa de la pared gástrica que ecográficamente encontremos engrosada. En ocasiones, podemos observar pérdida de diferenciación de capas^{23, 24, 25}. Para que la ecografía del estómago nos de una información adecuada en los tumores gástricos, es muy importante, no solo el poder de resolución del equipo de ecografía, sino el adiestramiento y la experiencia del observador²⁶.

Para obtener un diagnóstico definitivo es necesaria la toma de biopsia de la masa gástrica. La realización de una exploración endoscópica y su correspondiente toma de biopsia es una técnica

diagnóstica, mínimamente invasiva, de utilidad en los tumores gástricos que afectan a la mucosa (adenomas, carcinomas y linfosarcomas), pues nos permite localizar exactamente el tumor, valorar su extensión, así como la toma de biopsias de diferentes zonas²⁷. En algunos tumores, y fundamentalmente, cuando se trata de tumores que afectan a capas más profundas (leiomiomas, leiomiomasarcomas y tumores estromales), la exploración endoscópica no es válida para el diagnóstico, teniendo que recurrir a la laparotomía exploradora y la toma de biopsia de todo el grosor de la pared gástrica^{19, 20, 28}.

Las neoplasias gástricas primarias que podemos encontrar con mayor frecuencia en la especie canina son: adenoma, carcinoma, linfosarcoma, leiomioma, leiomiomasarcoma y tumores estromales^{18, 19, 20, 28, 29}. También han sido descritos otros tumores menos frecuentes como el plasmocitomas, sarcomas y gastrinomas^{20, 30, 31}.

Los adenomas gástricos (pólipos no neoplásicos y adenomas verdaderos) suelen ser lesiones polipoides de aspecto pedunculado (pólipos), de presentación solitaria o múltiple, encontrándose con mayor frecuencia en antro pilórico (Figura 2). Histológicamente los adenomas gástricos están formados por tejido glandular de crecimiento irregular; con varias capas celulares, observándose una clara atipia ce-



Figura 2. Adenomas en antro pilórico. Imagen endoscópica de antro pilórico.



GASTROENTEROLOGÍA EN ANIMALES DE COMPAÑÍA

lular. Habitualmente son asintomáticos, pudiendo provocar estenosis pilórica cuando estos son de gran tamaño. Suelen ser hallazgos no significativos en gastroscopias, cirugías gástricas y necropsias³². Los pólipos no neoplásicos son hiperplasias inflamatorias, mientras que los adenomas verdaderos pueden tener características premalignas (los pólipos no neoplásicos sólo pueden diferenciarse de los adenomas verdaderos mediante un diagnóstico histopatológico). El estatus exacto de las lesiones polipoides gástricas es problemático; no siempre está claro si se tratan de hiperplasias inflamatorias o de neoplasias benignas. La importancia de esta diferenciación es que los adenomas verdaderos pueden tener características premalignas y evolucionar hacia carcinoma³³.

Los leiomiomas, leiomiosarcomas y tumores estromales son neoplasias que se localizan fundamentalmente en antro pilórico, esfínter gastroduodenal y primeros tramos de duodeno, afectando a capas profundas de la pared del digestivo. También han sido descritos en la zona próxima al esfínter gastroesofágico (frecuentemente como extensión de un tumor esofágico). Son de presentación infrecuente. Suelen provocar alteraciones en la motilidad gástrica (retardo en el vaciado gástrico) y estenosis pilórica^{28,29}.

El carcinoma gástrico es el tumor maligno de mayor incidencia de presentación en el estómago del perro (baja incidencia en gatos). Su presentación es de un 75% de los tumores gástricos del perro^{5,14,15}. El carcinoma gástrico es considerado una neoplasia de perros viejos, pero ha sido descrito con un amplio rango de edades, desde 3 hasta 16 años, estableciendo una edad media de 9,5 años^{18,20}. Parece no existir predisposición en cuanto al sexo, si bien parece afectar con mayor frecuencia a los perros machos. Se ha descrito predisposición racial

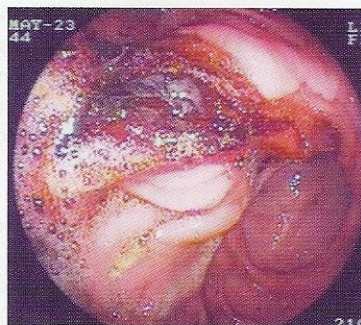


Figura 3. Carcinoma gástrico. Imagen endoscópica de curvatura menor (incisura angular) del cuerpo gástrico.

para los carcinomas gástricos en Cairn terriers, West Highland White terriers, Collies, Staffordshire bull terriers, Chow-Chows y Pastor Belga²⁰. La localización más frecuente es en la curvatura menor del cuerpo gástrico (incisura angular) y en el antro pilórico, si bien han sido descritas otras localizaciones gástricas como la curvatura mayor del cuerpo gástrico²⁷. Los tumores localizados en el cuerpo gástrico tienden a infiltrar ampliamente dentro de la pared del estómago, mientras que los carcinomas pilóricos se describen como menos agresivos y que tienden a comprometer solo la región del antro pilórico, formando una estructura anular. El carcinoma gástrico es un tumor mucoso que suele tener aspecto de masa con ulceración central, y que frecuentemente presenta sangrado activo (Figura 3). Suele provocar metástasis en ganglios linfáticos regionales (ganglios linfáticos gástricos y hepáticos), en hígado, en páncreas, en bazo y en pulmón (por vía linfática); también han sido descritas metástasis en peritoneo y en diafragma^{20,27}.

Histológicamente los carcinomas gástricos del perro pueden ser divididos en diferentes tipos según su patrón de crecimiento. La clasificación de OMS sobre tumores del aparato digestivo de los animales domésticos del 2003 los di-

vide en: adenocarcinoma papilar; adenocarcinoma tubular; adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células en anillo de sello, y carcinoma indiferenciado o sólido³⁴. De ellos, el carcinoma de células en anillo de sello y el carcinoma indiferenciado parecen ser los más frecuentes.

El linfosarcoma es de presentación rara en el perro (más frecuente en el gato), si bien en los últimos años, en nuestra experiencia, su frecuencia de presentación ha aumentado significativamente. Los linfosarcomas constituyen del 12 al 15% de las neoplasias gástricas caninas, siendo el segundo tumor maligno más frecuente en el perro. El linfosarcoma gástrico es la segunda localización más frecuente del linfoma alimentario solitario, por detrás del intestino delgado^{15,16}. Provoca una infiltración difusa en lámina propia y en submucosa^{15,16}. Puede afectar a cualquier parte del estómago, si bien el antro pilórico y las primeras porciones de duodeno son las zonas donde con mayor frecuencia aparece (Figura 4). También se han descrito formas multifocales (son mucho menos comunes), donde se observan masas gástricas asociadas con lesiones en intestino delgado o en colon^{14,15,16,35}. La determinación del inmunofenotipo es importante a la hora de establecer un pronóstico. Los de tipo B son más frecuentes, mientras que los linfomas de tipo T tienen peor pronóstico y por lo general son más agresivos e invasivos³⁵.

La terapéutica de elección en la mayor parte de los tumores gástricos es el tratamiento quirúrgico, siempre y cuando sea posible. La gastroectomía parcial es la técnica quirúrgica a utilizar, siendo necesaria en muchas ocasiones la realización de una anastomosis gastroduodenal o anastomosis gastroyeyunal, en función de la extensión del tumor^{36,37}. Durante la cirugía es conveniente revisar los ganglios linfáticos regionales, y actuar

sobre ellos si estuvieran afectados³⁶.

La quimioterapia es una alternativa postquirúrgica en el carcinoma gástrico. Se utilizan derivados de 5-fluoruracilo y mitomicina, pero los resultados son bastante inciertos^{20,38}. La quimioterapia en el linfosarcoma tiene mejores resultados, utilizando el protocolo COAP (ciclofosfamida, vincristina, arabinósido de citosina y prednisona) de inducción y después el protocolo LMP (clorambucilo, metotrexato y prednisona) de mantenimiento. Actualmente para el linfosarcoma se está empleando, con buenos resultados, el protocolo Wisconsin - Madison, que combina vincristina, ciclofosfamida, L-asparaginasa, doxorubicina y prednisona^{39,40,41}.

La esperanza de vida en perros con carcinoma gástrico sin tratar quirúrgicamente es de 3 meses desde que aparecen los primeros síntomas; si se elimina el tumor quirúrgicamente esta esperanza de vida se eleva hasta los 6 meses. En el caso del linfosarcoma gástrico, con quimioterapia (protocolo Wisconsin - Madison) la esperanza de vida es bastante mayor, oscilando entre los 12 hasta los 18 meses en función de su fenotipo; los linfosarcomas de fenotipo B suelen tener una mejor respuesta a la quimioterapia^{20,41}. No existen datos estadísticos referentes a la esperanza de vida en los tumores mesenquimatosos, si bien hay que pensar



Figura 4. Linfosarcoma gástrico. Imagen endoscópica de curvatura mayor del cuerpo gástrico.



que la cirugía correctora del tránsito gástrico puede dar lugar a una buena esperanza de vida.

NEOPLASIAS DE INTESTINO DELGADO

Las neoplasias de intestino delgado tienen una baja incidencia de presentación, siendo el linfosarcoma y el carcinoma los tumores que pueden aparecer con mayor frecuencia. Los tumores musculares son mucho menos frecuentes, considerándose tumores de presentación rara en el intestino delgado del perro^{1,4,5}.

El linfosarcoma intestinal es el tumor más frecuente en el intestino delgado de los pequeños animales, y se caracteriza por la infiltración de la mucosa y de la submucosa. Suelen presentarse de forma difusa, afectando a grandes porciones del intestino delgado (Figura 5), si bien también puede aparecer en forma focal (en forma de masa) provocando obstrucciones intestinales. La forma difusa afecta habitualmente a zonas craneales del intestino delgado (duodeno y yeyuno), y la forma focal es más frecuente en ileon^{40,41}. En algunas ocasiones el linfosarcoma de intestino delgado se presenta después del padecimiento de una enteritis crónica linfoplasmocitaria de carácter grave; si bien esta evolución, desde el proceso inflama-

torio crónico hacia el linfosarcoma de intestino delgado, no está totalmente demostrada en la especie canina⁴².

El carcinoma de intestino delgado en el perro suele aparecer en duodeno, en forma de masa que habitualmente provoca sintomatología variada, que va desde la presencia de diarrea, hasta la obstrucción parcial o total⁴³.

Estas neoplasias de intestino delgado provocan una sintomatología de diarrea crónica de intestino delgado y vómitos crónicos, unido a una pérdida de peso progresiva. Si aparecen en forma de masa, pueden provocar obstrucciones intestinales parciales o totales. La hematología y la bioquímica clínica de estos pacientes pueden desprender resultados de normalidad, pero en muchas ocasiones podemos encontrar anemias e hipoproteinemias⁴³.

Los estudios radiológicos simples y de contraste no suelen ser de utilidad diagnóstica. La ultrasonografía es de mayor utilidad, pues permite valorar engrosamientos de la pared intestinal, diferenciar que capa de la pared está engrosada, e incluso valorar la presencia de linfadenopatías⁴⁴. La ecografía abdominal también resulta de mucha utilidad, pues nos permite localizar la porción de intestino delgado que está afectada.

Para obtener un diagnóstico definitivo es necesaria la realización de una toma de biopsia con su correspondiente estudio histopatológico. La toma de biopsia la podremos realizar por endoscopia o por cirugía convencional. La endoscopia y toma de biopsia diagnóstica es de utilidad en los tumores localizados en los primeros tramos intestinales (mediante una gastroduodenoscopia), o bien en la última porción de ileon (endoscopia de ileon a través de una colonoscopia). En algunas ocasiones, y fundamentalmente, cuando se trata de tumores localizados en ye-



Figura 5. Linfosarcoma de Intestino delgado. Imagen endoscópica de duodeno descendente.

yuno, la exploración endoscópica no es válida para el diagnóstico, teniendo que recurrir a la laparotomía exploradora y toma de biopsia.

El tratamiento de elección del carcinoma de intestino delgado es la cirugía (enteroectomía), siendo su pronóstico reservado. La quimioterapia en estos casos no se ha demostrado eficaz. El tratamiento del linfosarcoma de intestino delgado se basa en la quimioterapia oncológica (protocolo COAP, protocolo LMP y protocolo Wisconsin – Madison), siendo su pronóstico mejor que el del carcinoma^{40,41}. La determinación del fenotipo en el linfosarcoma intestinal es importante para la evaluación del pronóstico; los linfomas de tipo T tienen peor pronóstico, respondiendo peor a la quimioterapia, y por lo general son más agresivos⁴⁵.

NEOPLASIAS DE INTESTINO GRUESO

Las neoplasias de intestino grueso aparecen fundamentalmente en animales de edades avanzadas y los perros machos parecen tener una mayor predisposición a padecer carcinoma y linfosarcoma de colon. También ha sido descrita una predisposición racial. Las razas Pastor Alemán y Collie tienen una mayor incidencia de lesiones neoplásicas colorrectales⁴⁶.

Los tumores de intestino grueso que podemos encontrar con mayor frecuencia en la especie canina son los pólipos (pólipos no neoplásicos y adenomas verdaderos), los carcinomas y los linfosarcomas, siendo los tumores musculares (leiomioma, leiomiomasarcoma y tumores estromales) de presentación muy rara^{1,3,46}.

Los signos clínicos asociados con neoplasias colónicas y rectales son esencialmente tenesmo, disquecia, hematoquecia y eliminación de moco con las heces. En

muchas ocasiones esta sintomatología puede pasar desapercibida en las primeras fases de la enfermedad^{46,47}.

Para el diagnóstico es imprescindible hacer una correcta anamnesis para detectar la sintomatología compatible con neoplasia de intestino grueso, y una exploración física completa que incluya una palpación abdominal y rectal. Gran parte de las neoplasias localizadas en la zona rectal se pueden detectar a través del ano realizando una cuidadosa palpación de la mucosa rectal^{46,48}.

Los estudios radiológicos simples dan escasa información. En cambio, las radiografías de contraste dan información en la detección de lesiones anulares o intraluminales dentro del intestino grueso. La radiología con sulfato de bario nos informa de zonas de irregularidad de la mucosa, estrechamientos de la luz y engrosamiento o nódulos intramurales^{46,48}.

La ecografía es una técnica diagnóstica muy eficaz en el diagnóstico de tumores de intestino grueso en el perro, siendo de gran utilidad en la evaluación de lesiones murales, motilidad gastrointestinal y detección de cambios abdominales asociados como linfadenopatías⁴⁶.

La exploración endoscópica del intestino grueso es la técnica que tiene una mayor utilidad en el diagnóstico de estas neoplasias en el perro; permite, no sólo tomar biopsias para su posterior estudio histopatológico, sino la determinación del tamaño, localización, multiplicidad y presencia de enfermedad inflamatoria intestinal concurrente. Las biopsias tomadas por endoscopia de masas en intestino grueso deben interpretarse con precaución ya que pueden subestimar la gravedad de la lesión. La toma de biopsias y su posterior estudio histopatológico son imprescindibles para alcanzar un diagnóstico correcto^{46,47,48}.

Los tumores de intestino grueso tienen una localización diferente en función



del tipo de tumor. Los pólipos (pólipos no neoplásicos y adenomas verdaderos) aparecen más frecuentemente en recto y en la unión colorrectal. El carcinoma se encuentra preferentemente en porción media del recto y en zona colorrectal. En cambio, el linfosarcoma puede localizarse en cualquier zona del intestino grueso⁴⁹. Los pólipos no neoplásicos y los adenomas suelen representarse macroscópicamente como crecimientos de aspecto polipoide (Figura 6). Los carcinomas se representan macroscópicamente como masas hacia la luz intestinal, o también de forma infiltrante afectando a una porción más o menos extensa del intestino grueso (Figura 7). También está descrita la forma difusa anular del carcinoma de colon, que se caracteriza por afectar a toda la circunferencia colónica (Figura 8). El linfosarcoma pueden adquirir el aspecto de masa localizada, o bien aparecer de forma difusa con una extensión más amplia (Figura 9)^{48, 49, 50}.

El uso del piroxicam para el tratamiento de los pólipos no neoplásicos de la porción distal del intestino grueso parece dar resultados satisfactorios⁵¹. El tratamiento clásico en los pólipos no

neoplásicos y adenomas es la exéresis de la masa, bien por polipectomía endoscópica o bien por cirugía convencional^{52, 53}.

El tratamiento del carcinoma de intestino grueso se basa en la cirugía (exéresis de la masa o bien enterectomía de colon si el tumor es infiltrativo y con una amplia extensión), teniendo habitualmente un buen pronóstico. Debemos tener en cuenta que el carcinoma de presentación anular tiene peor pronóstico debido fundamentalmente a su carácter invasivo y a la mayor dificultad quirúrgica^{50, 53}. La técnica quirúrgica de tracción del recto a través del ano para la enterectomía en los casos de carcinoma parece tener buenos resultados y resulta menos invasiva para el paciente⁵⁴.

El linfosarcoma de intestino grueso suele responder bastante bien a la quimioterapia (protocolo COAP, protocolo LMP y protocolo Wisconsin – Madison), con una aceptable esperanza de vida. La determinación del fenotipo en el linfosarcoma intestinal es importante para la evaluación del pronóstico. Los linfomas de tipo T tienen peor pronóstico, respondiendo peor a la quimioterapia^{40, 41, 45}.



Figura 6. Adenoma recto. Imagen endoscópica de recto.



Figura 7. Carcinoma de intestino grueso. Imagen endoscópica de zona colorrectal.





Figura 8. Carcinoma de intestino grueso. Imagen endoscópica de zona colorrectal.

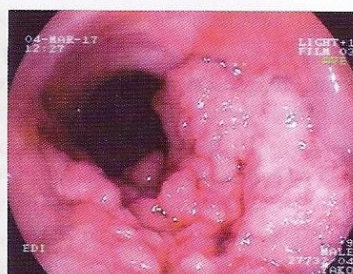


Figura 9. Linfomasarcoma de intestino grueso. Imagen endoscópica de colon descendente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Leibman, N.F.; Larson, V.S.; Ogilvie, G.K.: Oncologic diseases of the digestive system. In Tams, T.R. (ed.): Handbook of small animal gastroenterology. (2ª Ed). Ed. W.B. Saunders Company: Philadelphia, 2003: 370-415.
2. Merlo, D.F.; Rossi, L.; Pellegrino, C.; Ceppi, M.; Cardellino, U.; Capurro, C.; Ratto, A.; Sambucio, P.L.; Sestito, V.; Tanara, G.; Bocchini, V.: Cancer incidence in pet dogs: findings of the animal tumor registry of Genoa, Italy. *J. Vet. Intern. Med.*, 22 (4) 2008: 976-984.
3. Bettini, G.; Morini, M.; Marcato, P.S.: Gastrointestinal spindle cell tumours of the dog: histological and immunohistochemical study. *J. Comp. Pathol.*, 129, 2003: 283-293.
4. Frank, J.D.; Reimer, S.B.; Kass, P.H.; Kiupel, M.: Clinical outcomes of 30 cases (1997-2004) of canine gastrointestinal lymphoma. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 43 (6), 2007: 313-321.
5. Penninck, D.G.: Characterization of gastrointestinal tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 28, (4) 1998: 777-795.
6. Frost, D.; Lasota, J.; Miettinen, M.: Gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas in the dog: a histopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 50 cases. *Vet. Pathol.*, 40 (1), 2003: 42-54.
7. Mylonakis, M.E.; Rallis, T.; Koutinas, A.F.: Canine spirocercosis. *Compend. Contin. Educ. Vet.*, 30 (2), 2008: 111-116.
8. Van der Merwe, L.L.; Kirberger, R.M.; Clift, S.; Williams, M.; Keller, N.; Naidoo, V.: Spirocerca lupi infection in the dog: a review. *Vet. J.*, 176 (3) 2008: 294-309.
9. Ranen, E.; Lavy, E.; Aizenberg, I.; Perl, S.; Harrus, S.: Spirocerosis-associated esophageal sarcomas in dogs. A retrospective study of 17 cases (1997-2003). *Vet. Parasitol.*, 119 (2-3), 2004: 209-21.
10. Farese, J.P.; Bacon, N.J.; Ehrhart, N.P.; Bush, J.; Ehrhart, E.J.; Withrow, S.J.: Oesophageal leiomyosarcoma in dogs: surgical management and clinical outcome of four cases. *Vet. Comp. Oncol.*, 6 (1) 2008: 31-38.
11. Tams, T.R.: Diseases of the esophagus. In Tams, T.R. (ed.): Handbook of small animal



gastroenterology. (2ª Ed). Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia 2003: 118-158.

12. Jergens, A.E. : Diseases of the Esophagus. En Ettinger, S.J. and Feldman, E.C. (eds.): Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat. Ed Elsevier Saunders (6ª Ed.). St. Louis, 2005: 1298-1310.

13. Ranen, E.; Shamir, M.H.; Shahar, R.; Johnston, D.E. : Partial esophagectomy with single layer closure for treatment of esophageal sarcomas in 6 dogs. Vet. Surg. 33 (4) 2004: 428-434.

14. Denovo, R.C. : Diseases of the stomach. In Tams, T.R. (ed.): Handbook of small animal gastroenterology. (2ª Ed). Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia, 2003: 159-194.

15. Guilford, W.G.; Strombeck, D.R. : Chronic Gastric diseases". In Strombeck, D.R. et al. (eds.): Strombeck's Small Animal Gastroenterology. Ed. W.B. Saunders Company (3ª Ed.), Philadelphia, 1996: 275-302.

16. Simpson, K.W. : Diseases of the Stomach. En Ettinger, S.J. and Feldman, E.C. (eds.): Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat. Ed Elsevier Saunders (6ª Ed.). St. Louis, 2005 : 1310-1331.

17. Denlinger, R.H.; Koestner, A.; Swenberg, J.A.: Neoplasms in purebred boxer dogs following long-term administration of N-methyl-N-nitrosourea. Cancer Res., 38 (6), 1978:1711-1717.

18. Sullivan, M.; Lee, R.; Fisher, E.W.; Nash, A.S.; McCandlish, I.: A study of 31 cases of gastric carcinoma in dogs. Vet. Rec. 120, 1987: 79-83.

19. Swann, H.M.; Holt, D.E.: Canine gastric adenocarcinoma and leiomyosarcoma: a retrospective study of 21 cases (1986-1999) and literature review. J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 38 (2), 2002: 157-164.

20. Gualtieri, M.; Monzeglio, M.G.; Scanziani, E.: Gastric neoplasia. Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract., 29 (2), 1999: 415-40.

21. Prosek, R.; Pechman, R.D.; Taboada, J. : "Using radiographs to diagnose the cause of vomiting in a dog". Vet. Med., 95 (9), 2000: 688-690.

22. Muñoz, F.; Rodríguez-Quirós, J.; Rodríguez-Franco, F.; Llorens, M.P.; García, P.; San Román, F.: Estudio radiológico de los tumores gástricos en pequeños animales. O` Med. Vet., 40, 1994: 25-34.

23. Beck, C.; Slocombe, R.F.; O'Neill, T.; Holloway, S.A.: The use of ultrasound in the investigation of gastric carcinoma in a dog". Aust. Vet. J., 79 (5), 2001: 332-334.

24. Rivers, B.J.; Walters, P.A.; Johnston, G.R.; Feeney, D.A.; Hardy, R.M. : Canine gastric neoplasia: utility of ultrasonography in diagnosis. J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 33, 1997: 144-155.

25. Lamb, C.R.; Grierson, J.: Ultrasonographic appearance of primary gastric neoplasia in 21 dogs. J. Small Anim. Pract., 40(5), 1999: 211-215.

26. Easton, S.: A retrospective study into the effects of operator experience on the accuracy ultrasound in the diagnosis of gastric neoplasia in dogs. Vet. Radiol. Ultrasound. 42 (1), 2001: 47-50.

27. Rodríguez-Franco, F.; Carrasco, V.; Rodríguez, A.; Canfrán, S.; García-Sancho, M.; Sainz, A.: "Carcinoma gástrico en el perro: Localización endoscópica y aspecto macroscópico". Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, 3 (1), 2009: 72-80.

28. Russell, K.N.; Mehler, S.J.; Skorupski, K.A.; Baez, J.L.; Shofer, F.S.; Goldschmidt, M.H.: Clinical and immunohistochemical differentiation of gastrointestinal stromal tumors from



leiomyosarcomas in dogs: 42 cases (1990-2003). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 230(9), 2007:1329-1333.

29. Frost, D.; Lasota, J.; Miettinen, M.: Gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas in the dog: a histopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 50 cases. *Vet. Pathol.*;40(1) 2003: 42-54.

30. Fant, P.; Caldin, M.; Furlanello, T.; De Lorenzi, D.; Bertolini, G.; Bettini, G.; Moroni, M.; Masserdotti, C.: Primary gastric histiocytic sarcoma in a dog. A case report. *J. Vet. Med. A*, 51 (7-8) 2004: 358-362.

31. Fukushima, R.; Ichikawa, K.; Hirabayashi, M.; Yamagami, T.; Koyama, H.; Hirose, H.; Uchino, T.: A case of canine gastrinoma. *J. Vet. Med. Sci.* 66(8), 2004:993-995.

32. Scanziani, E.; Crippa, L.; Giusti, A. M.; Gualtieri, M.; Mandelli, G.: Argrophil cells in gastrointestinal epithelial tumours of the dog. *J. Comp. Pathol.*, 108, 1993: 405-409.

33. Murray, M.; Robinson, P. B.; McKeating, F. J.; Baker, G. J.; Lauder, I. M.: Primary gastric neoplasia in the dog: a clinico-pathological study. *Vet. Rec.*, 91, 1972: 474-479.

34. Head, K. W.; Cullen, J. M.; Dubielzig, R. R.; Else, R. W.; Misdorp, W.; Patnaik, A. K.; Tateyama, S.; Van der Gaag, I.: Definitions and exploratory notes. En *WHO Histological Classification of Tumors of the Alimentary System of Domestic Animals*. (2ª ed.) Washington, USA: Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology, 2003: 73-110.

35. De Zan G, Zappulli V, Cavicchioli L, Di Martino L, Ros E, Conforto G, Castagnaro M.: Gastric B-cell lymphoma with Mott cell differentiation in a dog. *J. Vet. Diagn.*, 21(5), 2009:715-719.

36. Fossum, T. W.; Hedlund, C. S.: Gastric and intestinal surgery. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.*, 33 (5), 2003: 1117-1145.

37. Bright, R. M.: Surgery of the stomach. En Birchard, S. J. & Sherding, R. G. (eds.): *Saunders Manual of Small Animal Practice*. W.B. Saunders Company. (2ª Ed.). Philadelphia, 2000: 777-786.

38. Stancliff, R. M.; Gilson, S. D.: Use of cisplatin, 5-fluorouracil, and second-look laparotomy for the management of gastrointestinal adenocarcinoma in three dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 225(9), 2004 :1412-1417.

39. Rassnick, K. M.; Moore, A. S.; Collister, K. E.; Northrup, N. C.; Cristal, O.; Chretien, J. D.; Bailey, D. B.: Efficacy of combination chemotherapy for treatment of gastrointestinal lymphoma in dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, 23(2), 2009:317-322.

40. Frank, J. D.; Reimer, S. B.; Kass, P. H.; Kiupel, M.: Clinical outcomes of 30 cases (1997-2004) of canine gastrointestinal lymphoma. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 43(6), 2007: 313-321.

41. Bassin, C. R.; Couto, C. G.; Wittum, T. E.: Factors influencing first remission and survival in 145 dogs with lymphoma: a retrospective study. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 36(5), 2000: 404-409.

42. Dandrieux, J. R.; Bormand, V. F.; Doherr, M. G.; Kano, R.; Zurbriggen, A.; Burgener, I. A.: Evaluation of lymphocyte apoptosis in dogs with inflammatory bowel disease. *Am. J. Vet. Res.*, 69 (10), 2008:1279-1285.

43. Hall, E. J.; German, A. J.: Diseases of the Small Intestine. En Ettinger, S. J. and Feldman, E. C. (eds.): *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat*. Ed Elsevier Saunders (6ª Ed.). St. Louis, 2005: 1332-1378.



44. Paoloni, M.C.; Penninck, D.G.; Moore, A.S: Ultrasonographic and clinicopathologic findings in 21 dogs with intestinal adenocarcinoma. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 43 (6), 2002: 562-567.
45. Coyle, K.A.; Steinberg, H.: Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma. *Vet. Pathol.*, 41, 2004: 141-146.
46. Washabau, R.J.; Holt, E.D.: Diseases of the Large Intestine. En Ettinger, S.J. and Feldman, E.C. (eds.): *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat*. Ed Elsevier Saunders (6ª Ed.). St.Louis, 2005: 1378-1408.
47. Rodríguez-Franco, F.; Sainz, A.; García-Sancho, M.; Delgado, J.; Mancho, C.; Benito, A.; Rodríguez-Bertos, A.: Sintomatología, localización endoscópica y estudio histopatológico de las neoplasias de intestino grueso en el perro: 16 casos clínicos. *Consulta de Difusión Veterinaria*, 113, 2004: 51-56.
48. Caruso, K.J.; Meinkoth, J.H.; Cowell, R.L.; Rochat, M.; Campbell, G.A.: A distal colonic mass in a dog. *Vet. Clin. Pathol.*, 32 (1), 2003:27-30.
49. Rodríguez-Franco, F.; Sainz, A.; Carrasco, V.; Benítez, S.; García-Sancho, M.; Mancho, C.; Benito, A.; Rodríguez-Bertos, A.: Localización de las neoplasias epiteliales de intestino grueso en el perro: estudio retrospectivo de 24 casos clínicos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2 (1), 2008: 31-38.
50. Prater, M. R.; Flatland, B.; Newman, S.J.; Sponenberg, D.P.; Chao, J.: Diffuse Annular Fusiform Adenocarcinoma in a Dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 36, 2000: 169-173.
51. Knottenbelt, C. M.; Simpson, J.W.; Tasker, S.; Ridyard, A. E.; Chandler, M. L.; Jamieson, P.M.; Welsh, E. M.: Preliminary clinical observations on the use of piroxicam in the management of rectal tubulopapillary polyps. *J. Small Anim. Pract.*, 41, 2000: 393-397.
52. Holt, P.E.: Evaluation of transanal endoscopic treatment of benign canine rectal neoplasia. *J. Small Anim. Pract.*, 48(1), 2007:17-25.
53. Danova, N.A.; Robles-Emanuelli, J.C.; Bjorling, D.E.: Surgical excision of primary canine rectal tumors by an anal approach in twenty-three dogs. *Vet. Surg.* 35(4), 2006:337-340.
54. Morello, E.; Martano, M.; Squassino, C.; Iussich, S.; Caccamo, R.; Sammartano, F.; Zabarino, S.; Bellino, C.; Pisani, G.; Buracco, P.: Transanal pull-through rectal amputation for treatment of colorectal carcinoma in 11 dogs. *Vet. Surg.*, 37(5), 2008:420-426.

ISSN: 1988-2688

<http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1>http://dx.doi.org/10.5209/rev_RCCV.2012.v6.n2.40175*Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2012 6(2):1-10*

**ENFERMEDAD INFLAMATORIA CRÓNICA INTESTINAL CON
HIPOPROTEINEMIA Y ASCITIS EN EL PERRO: 14 CASOS CLÍNICOS
INFLAMMATORY BOWEL DISEASE CAUSING HYPOPROTEINEMIA AND
ASCITIS IN THE DOG: 14 CASES**

Rodríguez-Franco, F. *; García-Sancho, M.; Carrasco, V.; Villaescusa, A.; Sainz, A.

Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria.

Universidad Complutense de Madrid.

*Correspondencia del autor: ferdiges@vet.ucm.es

RESUMEN

Las causas principales de enteropatía con pérdida de proteínas en perros son la linfangiectasia intestinal, la enfermedad inflamatoria crónica intestinal (EII) y el linfosarcoma intestinal. El objetivo fundamental de este trabajo es la caracterización clínica de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal con hipoproteinemia y ascitis en el perro. Para ello se ha realizado un estudio retrospectivo en el que se han revisado las historias clínicas de 14 perros. Los resultados de nuestro estudio demuestran que esta enfermedad es característica de perros adultos con edades medias en torno a los 5 años, y aparece con mayor frecuencia en las razas Yorkshire Terrier y Rottweiler. Los signos clínicos más frecuentes fueron: diarrea crónica de intestino delgado (100%), pérdida de peso (64%), vómitos (29%) y disminución del apetito (21%). Todos los pacientes del estudio presentaron unas proteínas séricas por debajo de 3,5 g/dl (valor medio de $2,83 \pm 0,44$ g/dl), con una albúmina inferior a 1,7 g/dl (valor medio de $1,45 \pm 0,17$ g/dl), con cociente albúmina/globulina en torno a 1.

PALABRAS CLAVE: enfermedad inflamatoria intestinal, hipoproteinemia, ascitis, perro

SUMMARY

The main causes of protein losing enteropathy in dogs are intestinal lymphangiectasia, inflammatory bowel disease (IBD) and intestinal lymphoma. The aim of this research is to

clínicamente caracterizar enfermedad inflamatoria intestinal causando hipoproteinemia y ascitis en el perro. Para este propósito se revisaron retrospectivamente los historiales clínicos de 14 perros. Los resultados del estudio actual muestran que esta enfermedad es más común en perros adultos con edades medias alrededor de 5 años, y más frecuentemente diagnosticada en Yorkshire Terrier y Rottweiler. Los signos clínicos incluyeron principalmente diarrea crónica con características intestinales (100%), pérdida de peso (64%), vómitos (39%) y disminución del apetito (21%). Todos los casos presentaron proteínas totales en suero inferiores a 3,5 g/dl (valor medio $2,83 \pm 0,44$ g/dl), albúmina inferior a 1,7 g/dl (valor medio $1,45 \pm 0,17$ g/dl), y fracción albúmina/globulina alrededor de 1.

KEYWORDS: Enfermedad inflamatoria intestinal, hipoproteinemia, ascitis, perro.

INTRODUCCIÓN

Cualquier enfermedad gastrointestinal grave puede ser causa de una enteropatía con pérdida de proteínas. Las causas principales de enteropatía con pérdida de proteínas en perros son la linfangiectasia intestinal, la enfermedad inflamatoria crónica intestinal (EII) y el linfosarcoma intestinal (Peterson, P.B. and Willard, M.D., 2003; Werner, LL. et al., 2004; Hall, E.J. and German, A.J., 2005). Otras enfermedades gastrointestinales que pueden cursar con pérdida de proteínas son la erosión y ulceración del tracto digestivo, y las parasitosis gastrointestinales (Williams, D.A., 1996; Peterson, P.B. and Willard, M.D., 2003).

La enfermedad inflamatoria crónica intestinal (EII) del perro es un conjunto de patologías crónicas cuya causa etiológica se desconoce (enfermedades idiopáticas); el infiltrado de células inflamatorias en la lámina propia de la mucosa intestinal, sugiere una respuesta inmunológica ante una variedad de antígenos, incluidos bacterias, dieta, o aquellos contenidos dentro de la propia mucosa intestinal (Hall, E.J. and German, A.J., 2005; Guilford, W.G., 1996). Este infiltrado inflamatorio origina la lesión de la mucosa, dando lugar a una absorción adicional de antígenos y factores flogísticos y a reacciones autoinmunes que acaban por cronificar el proceso. Como consecuencia del proceso inflamatorio crónico de la mucosa intestinal se van a producir diferentes alteraciones en la absorción, alteraciones en la permeabilidad intestinal, alteraciones en la flora propia intestinal y alteraciones en el peristaltismo, que conducen al desarrollo de la sintomatología (Hall, E.J. and German, A.J., 2005; Guilford, W.G., 1996).

En algunas ocasiones estas enfermedades inflamatorias (EII) pueden dar lugar a situaciones de hipoproteinemia con cociente albúmina/globulina entorno a 1. La hipoproteinemia es como consecuencia de la pérdida de proteínas hacia la luz del tubo digestivo, principalmente debido a las alteraciones de la permeabilidad en la mucosa intestinal, denominándose entonces como enteropatías perdedoras de proteínas. En situaciones de hipoproteinemias muy marcadas, y concretamente cuando los valores séricos de albúmina son inferiores a 2 g/dl, puede aparecer ascitis, situación indicativa de la gravedad de la enfermedad (Finco, D.R. et al., 1973; Peterson, P.B. and Willard, M.D., 2003; Ohno, K. et al., 2006; Allenspach, K. et al., 2007; Dijkstra, M. et al., 2010; Lecoindre, P. et al., 2010).

Además, estas enfermedades inflamatorias cónicas intestinales (EII) suelen cursar con signos digestivos tales como diarrea crónica de intestino delgado (como consecuencia del fallo en la absorción intestinal se produce un aumento de la presión osmótica en la luz del intestino, que conduce a una diarrea crónica), vómitos crónicos (que frecuentemente aparecen con el estómago vacío y suelen ser de color blanco-amarillento, e incluso biliosos), pérdida de peso (es como consecuencia del proceso inflamatorio de la mucosa intestinal que desencadena un síndrome de malabsorción intestinal) y episodios de dolor abdominal crónico (Tams T.R., 2003; Craven, M. et al., 2004; Allenspach, K. et al., 2007; García-Sancho, M. et al., 2007).

Para el diagnóstico de este conjunto de enfermedades es necesaria la realización de un protocolo diagnóstico de exclusión. La endoscopia digestiva (gastroduodenoscopia) y biopsia son el punto final en el protocolo diagnóstico (Washabau, R. et al., 2010). Habitualmente la gastroduodenoscopia revela la existencia de un proceso inflamatorio crónico en intestino delgado, con mucosa irregular, engrosada y congestiva; en algunas ocasiones pueden aparecer úlceras, erosiones e incluso un punteado de color blanco (imagen macroscópica compatible con dilatación de vasos linfáticos). El estudio anatomopatológico de las biopsias es fundamental a la hora del diagnóstico. En función de la celularidad encontrada en la lámina propia de la mucosa y de las características histopatológicas, nos permite diferenciar entre los diferentes tipos de enteritis crónicas, y también nos da una información muy importante en cuanto a alteraciones vasculares (edema intercelular y linfangiectasia) que debemos tener en cuenta para el pronóstico de la enfermedad (Day, M.J. et al., 2008).

El objetivo fundamental de este trabajo, de carácter retrospectivo, es la caracterización clínica de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal con hipoproteinemia y ascitis en el perro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se ha realizado un estudio retrospectivo (entre Enero de 2001 y Enero de 2010) en el que se han revisado las historias clínicas de 14 perros a los que se les ha diagnosticado una enfermedad inflamatoria crónica intestinal con hipoproteinemia y ascitis. Todos ellos fueron atendidos por el servicio de Gastroenterología y Endoscopia del Hospital Clínico Veterinario Complutense (HCVC) de Madrid.

En todos los casos, el diagnóstico de la enfermedad se llevó a cabo mediante un completo diagnóstico de exclusión basado en la realización de: anamnesis, exploración física, análisis de sangre (perfil hematológico y bioquímico), análisis coprológico de las heces de 3 días consecutivos y pruebas de quimotripsina fecal y TLI. Una vez obtenidos resultados normales en todas las pruebas anteriores, se procedió a la realización de una endoscopia digestiva superior con toma de biopsias.

Previo a la endoscopia digestiva superior los animales pasaron por 24 horas de ayuno de sólidos y 12 horas de ayuno de líquidos. A todos se les realizó una anestesia general con intubación endotraqueal. Para las exploraciones endoscópicas de estos animales se utilizaron videoendoscopios de diferentes longitudes y diámetros en función del tamaño del animal. En todos los perros se tomaron biopsias endoscópicas mediante pinzas de biopsia tipo cazoleta para su posterior estudio histopatológico.

En estos pacientes se ha valorado la sintomatología digestiva, valores de proteínas en sangre, parámetros endoscópicos y parámetros histopatológicos (tal y como indican las directrices del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria para la evaluación de la inflamación gastrointestinal en animales de compañía) (Day, M.J. et al., 2008; Washabau, R. et al., 2010).

RESULTADOS

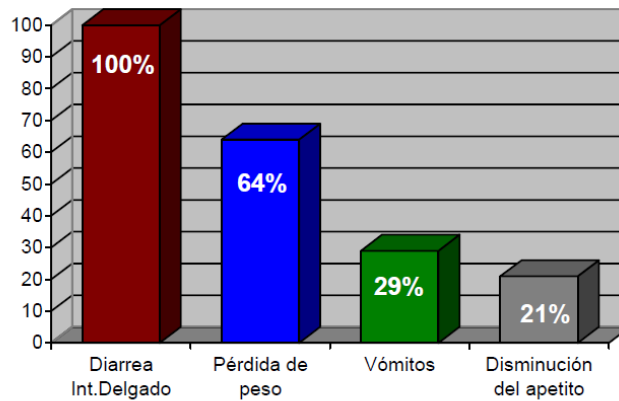
La edad media de los animales del estudio fue de $4,9 \pm 1,5$. El 50% eran de raza Yorkshire Terrier, y el 35% eran de raza Rottweiler. En cuanto al sexo, 10 de ellos eran machos y 4 hembras (Tabla 1).

Tabla 1. Casos clínicos incluidos en el estudio.

Caso Clínico Nº	Raza	E dad	S exo	Peso (kg)
1	Rottweiler	6	H	31,5
2	Rottweiler	4	M	32,5
3	Yorkshire	6	M	3,5
4	Yorkshire	5	H	3,4
5	Yorkshire	4	M	2,9
6	Rottweiler	4	M	42,9
7	Yorkshire	7	M	4,8
8	Rottweiler	3	M	36,5
9	Golden retriever	3	M	22,6
10	Yorkshire	7	H	2,9
11	Yorkshire	4	M	3,1
12	Yorkshire	6	M	3,5
13	Spaniel breton	3	H	19,5
14	Rottweiler	7	M	35,6

Además de la presencia de ascitis, los perros objeto de estudio mostraron los siguientes signos clínicos (Figura 1): diarrea crónica de intestino delgado (100%), pérdida de peso (64%), vómitos (29%) y disminución del apetito (21%).

Figura 1: Signos clínicos de los perros del estudio



Todos los pacientes del estudio presentaron unas proteínas séricas por debajo de 3,5 g/dl (valor medio de $2,83 \pm 0,44$ g/dl), con una albúmina inferior a 1,7 g/dl (valor medio de $1,45 \pm 0,17$ g/dl), con cociente albúmina/globulina en torno a 1 (Tabla 2).

Tabla 2: Valores de proteínas séricas y albúmina sérica de los perros del estudio.

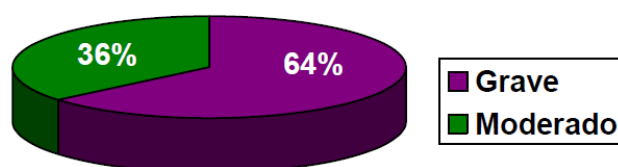
Caso Clínico N°	Proteínas(g/dl)	Albúmina (g/dl)
1	2,2	1,2
2	3	1,6
3	3	1,5
4	3,1	1,6
5	3,2	1,6
6	2	1,1
7	2,8	1,4
8	3,2	1,6
9	2,6	1,4
10	2,4	1,2
11	2,4	1,5
12	3,4	1,6
13	3,4	1,6
14	3,0	1,4

Todos los pacientes del estudio mostraron en la exploración endoscópica lesiones macroscópicas en duodeno compatibles con proceso inflamatorio crónico (mucosa engrosada,

irregular y congestiva). Los hallazgos macroscópicos fueron considerados de grado moderado en 2 perros y grave en los 12 restantes. El 50% de los casos presentaron un intenso punteado de color blanco (dilataciones linfáticas) en la mucosa intestinal, mientras que en el 50% restante, las dilataciones linfáticas fueron de carácter moderado o leve.

El estudio histopatológico mostró en todos los casos un infiltrado inflamatorio de tipo linfoplasmocitario, con lesiones graves en 9 pacientes (64% de los casos), y de carácter moderado en 5 pacientes, no habiéndose descrito lesiones leves en ningún paciente del estudio (Figura 2).

Figura 2: Gravedad histopatológica de los perros incluidos en el estudio.



DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran una población de perros objeto de estudio con representación de ambos sexos, así como de múltiples edades. Llama la atención el hecho de que el 72% de los perros fueran machos, sin que sea evidente hasta el momento una clara predisposición sexual en esta enfermedad. La edad media de presentación se corresponde con la esperada para la enfermedad inflamatoria intestinal, de acuerdo con estudios previos (Ohno, K. et al., 2006; Peterson, P.B. and Willard, M.D., 2003). Sin embargo, respecto a las razas, es de destacar la gran representación de Yorkshire Terriers y Rottweilers. Estudios previos coinciden en describir estas razas entre las más frecuentes en casos con enteropatía perdedora de proteínas (Lecoindre, P. et al., 2010; Peterson, P.B. and Willard, M.D., 2003).

La diarrea crónica de intestino delgado se describe como uno de los signos clínicos más frecuentes en la enfermedad inflamatoria intestinal y, de forma más general, en la enteropatía

perdedora de proteínas (Guilford, W.G., 1996; Tams T.R., 2003; Lecoindre, P. et al., 2010). Sin embargo, algunos autores consideran que este hallazgo no es constante pudiendo presentar los pacientes heces normales en ausencia de otros signos clínicos (Peterson, P.B. and Willard, M.D., 2003). En nuestro caso, todos los perros presentaban una diarrea crónica, característica de intestino delgado. La pérdida de peso y los vómitos descritos entre nuestros pacientes, también son signos clínicos habituales en la enfermedad inflamatoria crónica intestinal (Hall, E.J. and German, A.J., 2005; Williams, D.A., 1996; Dijkstra, M. et al., 2010)

La ascitis es un signo clínico frecuente en la enteropatía perdedora de proteínas. La ascitis es la manifestación clínica más frecuente de una grave hipoalbuminemia (Peterson, P.B. and Willard, M.D., 2003). Se considera que tanto la ascitis como el edema suelen aparecer con concentraciones séricas de albúmina menores de 2 g/dl para algunos autores. Todos los perros objeto de estudio presentaban valores de albúmina por debajo de 1,6 g/dl. La fisiopatología de la hipoproteïnemia que aparece en la enfermedad inflamatoria intestinal parece relacionada con factores tales como apetito reducido, malabsorción secundaria a una reducción de la superficie intestinal, hemorragia o exudación de proteínas hacia la luz y un incremento en la permeabilidad intestinal (Craven, M. et al., 2004; Allenspach, K. et al., 2007). Es importante resaltar en este punto, que la hipoproteïnemia, y más concretamente la hipoalbuminemia en la enfermedad inflamatoria intestinal, son situaciones asociadas a un mal pronóstico (Craven, M. et al., 2004; Allenspach, K. et al., 2007). Así por ejemplo, un estudio muy reciente describe que hasta un 65% de 17 Rottweilers con enteropatía perdedora de proteínas secundaria a una enfermedad inflamatoria intestinal fueron eutanasiados o murieron por su enfermedad intestinal (Dijkstra, M. et al., 2010).

La exploración endoscópica de los perros mostró alteraciones macroscópicas en todos ellos. El grado de estas lesiones se clasificó como grave en el 85% de los casos. En un trabajo previo se relaciona la presencia de lesiones graves en la mucosa del duodeno con un pronóstico negativo, garantizando la necesidad de un tratamiento más agresivo en el curso de la enfermedad (Allenspach, K. et al., 2007). Sin embargo, en nuestra experiencia, así como en la de otros autores no existe una clara relación entre los hallazgos endoscópicos, histopatológicos y los clínicos, por lo que una apariencia endoscópica muy alterada no siempre va unida a un mal pronóstico (Hall, E.J. and German, A.J., 2005; García-Sancho, M. et al., 2007), debiéndose valorar de forma conjunta las alteraciones clínicas, endoscópicas e histopatológicas.

Por otra parte cabe destacar la presencia de un punteado blanquecino en la mucosa duodenal de todos los perros objeto de estudio. Se ha sugerido que estos puntos blancos parecen corresponderse con vasos linfáticos dilatados localizados en el estroma de las vellosidades. Se ha demostrado que los perros con enfermedad inflamatoria intestinal con un punteado blanquecino en su duodeno presentan unas concentraciones de proteínas séricas significativamente inferiores que aquellos con esta misma enfermedad pero sin punteado blanquecino (Peterson, P.B. and Willard, M.D., 2003; García-Sancho, M. et al., 2011).

En relación al estudio histopatológico de las biopsias de duodeno, la gran mayoría de los perros mostraron un infiltrado inflamatorio de tipo linfoplasmocitario a nivel de la lámina propia. Este hallazgo no es de extrañar, ya que dentro de la enfermedad inflamatoria crónica de intestino delgado, la enteritis linfoplasmocitaria, destaca por ser con gran diferencia la más frecuente en el perro (Tams T.R., 2003; Craven, M. et al., 2004; Williams, D.A., 1996). Por otra parte, en más de la mitad de los perros incluidos, los hallazgos histológicos se clasifican como graves, lo que era de esperar en este grupo de pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

Allenspach, K.; Wieland, B.; Gröne, A. (2007): Chronic enteropathies in dogs: evaluation of risk factors for negative outcome. *J. Vet. Intern. Med.*: 21(4):700-708.

Craven, M.; Simpson, J.W.; Ridyard, A.E.; Chandler, M.L. (2004): Canine inflammatory bowel disease: retrospective analysis of diagnosis and outcome in 80 cases (1995-2002). *J. Small Anim. Pract.*, 45: 336-342.

Day, M.J.; Bilzer, T.; Mansell, J.; Wilcock, B.; Hall, E.J.; Jergens, A.; Minami, T.; Willard, M.; Washabau, R. (2008): Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from dog and cat: A report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *J. Comp. Path.*, 138: S1-S43.

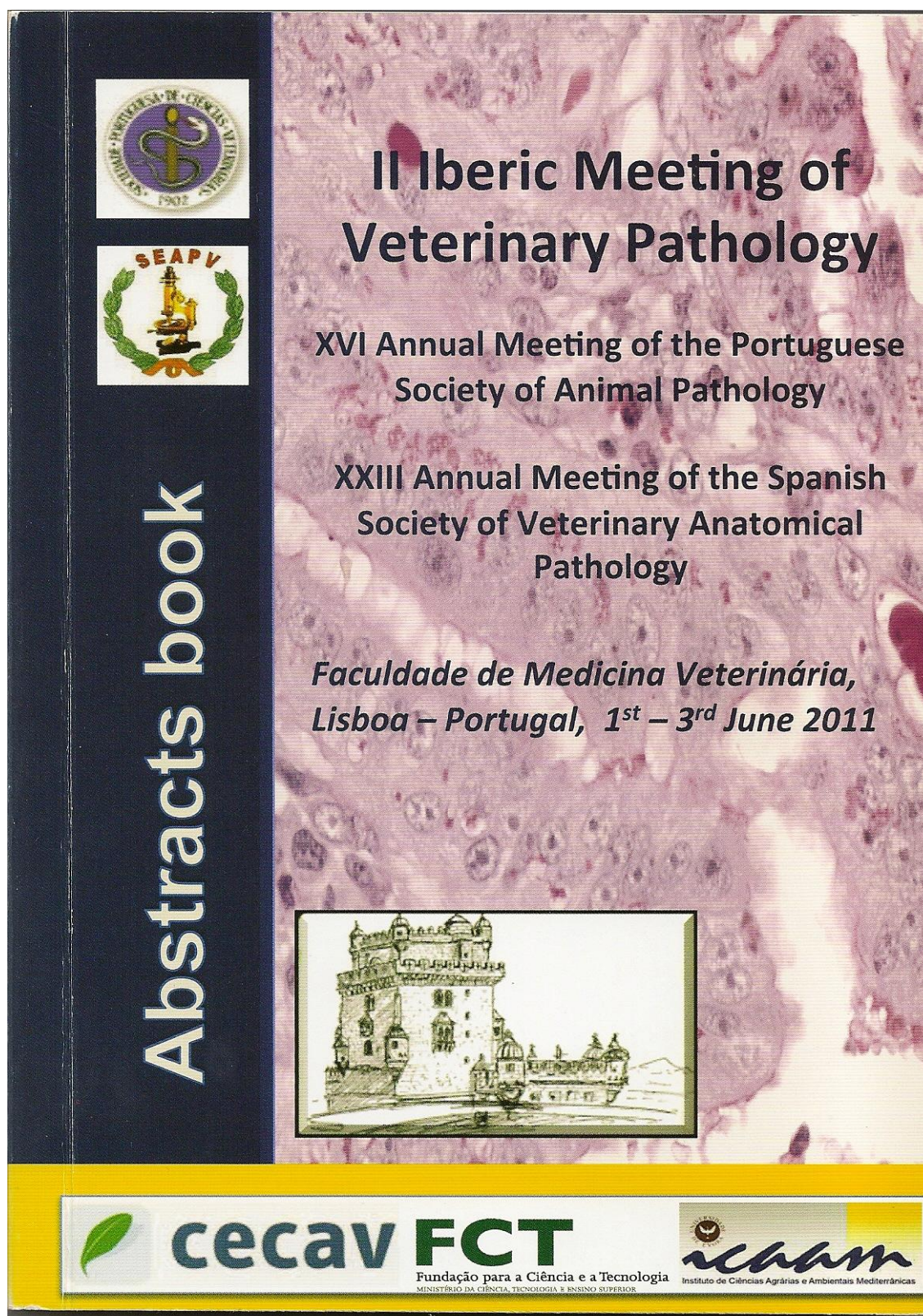
Dijkstra, M.; Kraus, J.S.; Bosje J.T.; Den Hertog, E. (2010): Protein-losing enteropathy in Rottweilers. *Tijdschr Diergeneeskde* 135: 406-412.

Finco, D.R.; Duncan, J.R.; Schall W.D. (1973): Chronic enteric disease and hypoproteinemia in 9 dogs. *J. A. V. M. A.*, 163: 262-271.

- García-Sancho M.; Rodríguez-Franco F, Sainz A, Mancho C, Rodríguez A (2007): Evaluation of clinical, macroscopic and histopathological response to treatment in nonhypoproteinemic dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis. *J. Vet. Intern. Med.*, 21:11-17.
- García-Sancho M.; Sainz, A.; Villaescusa, A.; Rodríguez, A.; Rodríguez-Franco, F. (2011): White spots on the mucosal surface of the duodenum in dogs with lymphocytic plasmacytic enteritis. *J. Vet. Sci.*, 12 (2): 165-169.
- Guilford, W.G. (1996): Idiopathic inflammatory bowel diseases. En: Strombeck DR, (ed.). *Strombeck's Small Animal Gastroenterology*, WB Saunders Co, Philadelphia: 1332-1378.
- Hall, E.J.; German, A.J. (2005): Diseases of the small intestine. En: Ettinger SJ and Feldman EC, (eds.). *Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of the dog and the cat*, Elsevier Saunders, St. Louis: 1332-1378.
- Lecoindre, P.; Chevallier, M.; Guerret, S. (2010): Protein-losing enteropathy of non neoplastic origin in the dog: A retrospective study of 34 cases. *Schweiz Arch Tierheilkd* 152: 141-146.
- Ohno, K.; Konishi, S.; Kobayashi, S.; Nakashima, K.; Setoguchi, A.; Fujino, Y.; Nakayama, H.; Tsujimoto, H. (2006): Prognostic Factors Associated with Survival in Dogs with Lymphocytic-Plasmacytic Enteritis. *Journal of Veterinary Medicine Sciences* 68: 929-933.
- Peterson, P.B.; Willard, M.D. (2003): Protein-losing enteropathies. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.*, 33: 1061-1082.
- Tams T.R. (2003): Chronic diseases of the small intestine. In: Tams TR, (ed.). *Handbook of Small Animal Gastroenterology*, WB Saunders Co, Philadelphia: 211-250.
- Washabau, R.; Day, M.J.; Willard, M.; Hall, E.J.; Jergens, A.; Mansell, J.; Minami, T.; Bilzer, T. (2010): Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. *J. Vet. Intern. Med.*, 24: 10-26.
- Werner, LL.; Turnwald, GH.; Willard, MD. (2004): Immunologic and plasma protein disorders. En: Willard, MD. y Tvedten, H. (eds.): *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, St Louis, Saunders: 290-305.
- Williams, D.A. (1996): Malabsorption, Small Intestinal Bacterial Overgrowth, and Protein-Losing Enteropathy. En: Strombeck DR, (ed.). *Strombeck's Small Animal Gastroenterology*, WB Saunders Co, Philadelphia: 367-380.

11.2 APORTACIONES A CONGRESOS

- CARRASCO, V.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; DEVESA, V.; SÁINZ, A.; GARCÍA-SANCHO, M.; RODRÍGUEZ-BERTOS, A. (2011): **“Differential diagnosis between lymphoma and IBD in canine duodenal endoscopic biopsy samples”**. II Iberic Meeting of Veterinary Pathology. Lisboa, Portugal (Carácter: Internacional).
- RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; GARCÍA-SANCHO, M.; CARRASCO, V.; VILLAESCUSA, A.; RODRÍGUEZ-BERTOS, A.; SÁINZ, A. (2010): **“Enfermedad inflamatoria crónica intestinal (IBD) con hipoproteinemia y ascitis en el perro: 14 casos clínicos”**. Congreso Nacional de A.V.E.P.A. Barcelona (Carácter: Nacional).
- CARRASCO, V.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; DEVESA, V.; CASTAÑO, M.; PIZARRO, M.; RODRÍGUEZ-BERTOS, A. (2010): **“Índice de proliferación celular Ki67 en el diagnóstico diferencial entre la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y el linfoma alimentario en el perro: aspectos endoscópicos e histopatológicos”**. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica. Valencia (Carácter: Nacional).



DIFFERENTIAL DIAGNOSIS BETWEEN LYMPHOMA AND INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD) IN CANINE DUODENAL ENDOSCOPIC BIOPSY SAMPLES.



Carrasco V, Rodríguez-Franco F, Devesa V, Sáinz A, García-Sancho M, Rodríguez-Bertos A
Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Hospital Clínico Veterinario.
Universidad Complutense de Madrid. violeta.carrasco@vet.ucm.es



Iberic Meeting of Veterinary Pathology, Lisbon, June 2011

INTRODUCTION

Inflammatory bowel disease (IBD), especially severe chronic lymphoplasmacytic enteritis, and intestinal lymphoma induce similar chronic digestive clinical signs, although each one requires a specific treatment and has different clinical outcome. To achieve an accurate diagnosis of these diseases, histopathological analysis of biopsy specimens is compulsory, once ruled out other conditions that also cause similar signs (mainly diet-responsive diarrhea, antibiotic-responsive diarrhea and intestinal parasites)^{5,7}. However, to differentiate between severe IBD and intestinal lymphoma has proved to be a difficult task for both clinicians and pathologists in cats and dogs^{1,3,4,6,11}. The aim of this investigation is to evaluate the differential histomorphologic parameters of both diseases, and to establish the diagnostic difference between microscopic examination of hematoxylin and eosin (HE)-stained sections alone, and HE-stained sections plus immunohistochemical labeled (IHC) sections for CD3 and CD79.

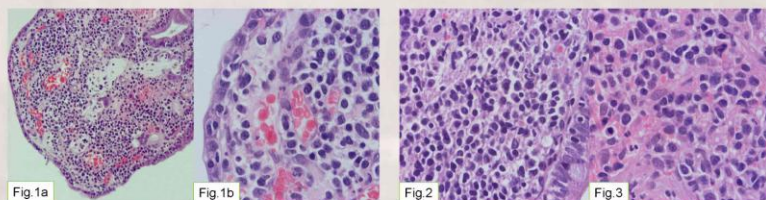
MATERIAL AND METHODS

Twenty-two dogs were included in this retrospective study, all with a clinical history of chronic diarrhea, chronic vomiting, or weight loss. All dogs underwent endoscopy and duodenal biopsy samples were obtained. Histopathological evaluation of H-E sections was performed, evaluating the standardized parameters for IBD^{3,10} and some others for intestinal lymphoma^{6,11}. Immunoreactivity of CD3 and CD79 was investigated by IHC, using the streptavidin-biotin-peroxidase complex method. Polyclonal rabbit anti-human CD3 (DakoCytomation) and monoclonal mouse anti-human CD 79 (clone HM57, DakoCytomation) antibodies were used.

RESULTS AND DISCUSSION

case	H-E	H-E + IHC
1	Lymphoma	T cell lymphoma
2	Severe IBD	Severe IBD
3	Severe IBD	T cell lymphoma
4	Lymphoma	TB cell lymphoma
5	Severe IBD	Severe IBD
6	Lymphoma	T cell lymphoma
7	Lymphoma	T cell lymphoma
8	Lymphoma	T cell lymphoma
9	Lymphoma	T cell lymphoma
10	Severe IBD	Severe IBD
11	Severe IBD	T cell lymphoma
12	Severe IBD	Severe IBD
13	Severe IBD	Severe IBD
14	Lymphoma	T cell lymphoma
15	Severe IBD	Severe IBD
16	Lymphoma	T cell lymphoma
17	Severe IBD	Severe IBD
18	Severe IBD	T cell lymphoma
19	Lymphoma	Severe IBD
20	Severe IBD	T cell lymphoma
21	Lymphoma	T cell lymphoma
22	Severe IBD	T cell lymphoma

Table 1. Case diagnosis

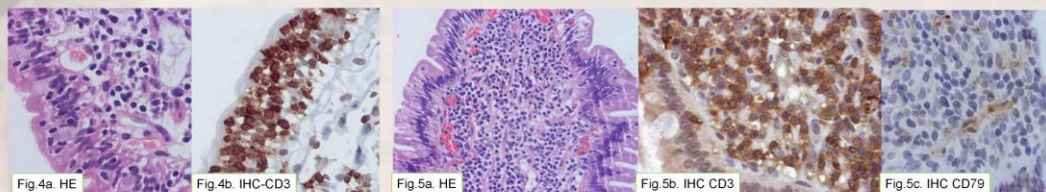


Case evaluation and diagnosis

Differential diagnosis between IBD and intestinal lymphoma resulted extremely difficult in H-E stained sections⁹. Initially 12 dogs were diagnosed as IBDs and 10 were diagnosed as lymphomas based on morphological evaluation under HE-staining. After combining the H-E evaluation with CD3 and CD79 immunoreactivity 5 cases originally diagnosed as IBD, were considered T cell lymphomas (fig. 5), and one lymphoma was reclassified as IBD (table 1). This fact has been described before in felines⁶. Results of CD79 immunoreaction should be considered cautiously, due to the lack of appropriate staining in some cases.

Morphologic evaluation

A marked increase in lamina propria lymphocytes and plasma cells was present in all 22 cases. Taking into account HE and IHC studies (CD3 and CD79), this infiltration was diffuse throughout all the samples but 7 cases, in which it was focal/multi-focal (3 lymphomas and 4 IBDs). In 9 cases the infiltrate was predominantly monomorphic, lymphocytic (7 lymphomas and 2 IBDs, fig 2), and polymorphic in the remaining samples (fig. 3). The standardized parameters available for IBD are not enough to allow the differential diagnosis with intestinal lymphoma, although they are useful for establishing the degree of IBD^{3,10}. Among them, villous epithelial injury was mild in 10 cases (6 lymphomas, 4 IBDs), moderate in 5 cases (3 lymphomas, 2 IBDs) and marked in 2 cases, both lymphomas (fig. 1). Intraepithelial lymphocytes were increased in 14 cases (grades 1, 2 and 3 of WSAVA standards⁹). After evaluation of CD3 staining, 8 formed nests (7 lymphomas, 1 IBD), and 5 formed plaques (all lymphomas, fig 4), following previous classifications⁶.



CONCLUSION: Immunohistochemical study of CD3 and CD79 represents an appropriate technique to enhance the diagnosis of lymphoproliferative disorders in dogs. However, definitive diagnosis using these proteins can be difficult in some cases, being therefore recommended to complement it with other diagnostic tools such as the proliferative index Ki67² and, if necessary, with specific polymerase chain reaction (PCR) for lymphocyte clonality^{1,6}.

REFERENCES

1. Briscoe KA, Kroschberger M, et al. Histopathological and immunohistochemical evaluation of 53 cases of feline lymphoplasmacytic enteritis and low-grade alimentary lymphoma. *J Comp Pathol* 2011; doi:10.1016/j.jcpa.2010.12.011.
2. Carrasco V, Rodríguez-Franco F, et al. Índice de proliferación celular Ki67 en el diagnóstico diferencial entre IBD y linfoma alimentario en el perro: aspectos endoscópicos e histopatológicos. XXII Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria. Valencia, 2010.
3. Day M, Blazer V, et al. Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *J Comp Pathol* 2008;138 Suppl 1: S1-43.
4. Evans S, Bonczynski J, et al. Comparison of endoscopic and full-thickness biopsy specimens for diagnosis of inflammatory bowel disease and alimentary tract lymphoma in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2006;229 (9): 1447-1450.
5. Quiford WG, Storchbeck DF. Neoplasms of the gastrointestinal tract. APUD tumors, endocrinopathies and the gastrointestinal tract. In: Strombeck's Small Animal Gastroenterology, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996: 519-531.
6. Kupeš M, Smedley RC, et al. Diagnostic algorithm to differentiate lymphoma from inflammation in feline small intestinal biopsy samples. *Vet Pathol* 2011;46 (1): 212-222.
7. Leibman NF, Larson VS, et al. Oncologic diseases of the digestive system. In: Tams, ed., TR: Handbook of small animal gastroenterology, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2003: 370-415.
8. Roth L, Leib M, et al. Comparisons between endoscopic and histologic evaluation of the gastrointestinal tract in dogs and cats: 75 cases (1984-1987). *J Am Vet Med Assoc* 1990;196 (4): 635-638.
9. Valli T. Hematopoietic system. In: Jubb-KIF, Kennedy PC, Palmer N, eds. Pathology of Domestic Animals, 5 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007:107-324.
10. Vashabau R, Day M, et al. Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. *J Vet Intern Med* 2010;24 (1): 10-26.
11. Willard M, Jergens A, et al. Interobserver variation among histopathologic evaluations of intestinal tissues from dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 2002;220 (8): 1177-1182.



ENFERMEDAD INFLAMATORIA CRÓNICA INTESTINAL (IBD) CON HIPOPROTEINEMIA Y ASCITIS EN EL PERRO: 14 CASOS CLÍNICOS.

Fernando Rodríguez-Franco, Mercedes García-Sancho, Violeta Carrasco, Alejandra Villaescusa, Antonio Rodríguez-Bertos, Ángel Sainz.

Gastroenterología y Endoscopia. Hospital Clínico Veterinario Complutense. Dpto. Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria de Madrid. España.

Introducción

Muchas enfermedades gastrointestinales pueden causar una enteropatía perdedora de proteínas si son lo suficientemente graves. No obstante, las causas principales de enteropatía perdedora de proteínas en perros son la linfangiectasia intestinal, los procesos inflamatorios crónicos intestinales y el linfosarcoma digestivo. La enfermedad inflamatoria crónica intestinal con hipoproteinemia y ascitis ha sido descrita como una patología de mal pronóstico.

El objetivo fundamental de este trabajo es la realización de un estudio retrospectivo de caracterización clínica de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal con hipoproteinemia y ascitis en el perro.

Materiales y Métodos

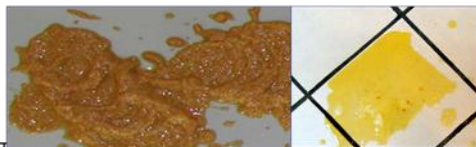
Se ha realizado un estudio retrospectivo (entre enero de 2001 y enero de 2010) en el que se han revisado las historias clínicas de 14 perros (10 machos y 4 hembras) diagnosticados de enfermedad inflamatoria crónica intestinal con hipoproteinemia y ascitis. En todos los casos se realizó un protocolo diagnóstico de exclusión, alcanzándose el diagnóstico final mediante el estudio histopatológico de las biopsias tomadas mediante endoscopia digestiva.

En estos pacientes se ha valorado la sintomatología digestiva, valores de proteínas en sangre, parámetros endoscópicos y parámetros histopatológicos (tal y como indican las directrices del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria para la evaluación de la inflamación gastrointestinal en animales de compañía).

Resultados

La edad media de los animales del estudio fue de $4,9 \pm 1,5$. El 50% (7 casos clínicos) eran de raza Yorkshire Terrier, y el 35% (5 casos clínicos) eran de raza Rottweiler.

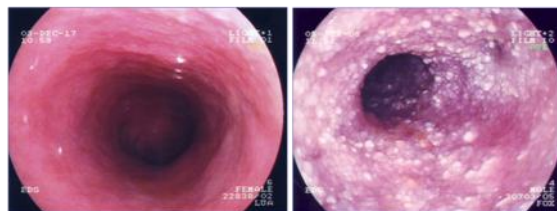
Además de la presencia de ascitis, el 100% de los casos presentaban diarrea crónica de intestino delgado, y tan solo 4 pacientes (29%) presentaron sintomatología de vómitos biliosos.



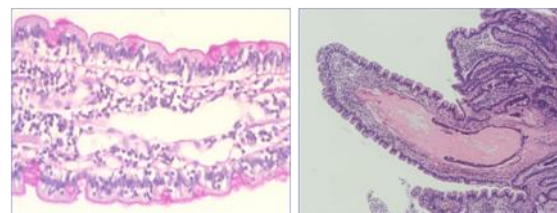
Todos los pacientes del estudio presentaron unas proteínas séricas por debajo de 3,5 g/dl (valor medio de $2,83 \pm 0,44$ g/dl), con una albúmina inferior a 1,7 g/dl (valor medio de $1,45 \pm 0,17$ g/dl), con cociente albúmina/globulina en torno a 1.

Resultados (Cont.)

Todos los pacientes del estudio mostraron en la exploración endoscópica lesiones macroscópicas en duodeno compatibles con proceso inflamatorio crónico (mucosa engrosada, irregular y congestiva). El 50% de los casos presentaron un intenso punteado de color blanco (dilataciones linfáticas) en la mucosa intestinal, mientras que en el 50% restante, las dilataciones linfáticas fueron de carácter moderado o leve.



El estudio histopatológico mostró lesiones graves en 9 pacientes (64% de los casos), y de carácter moderado en 5 pacientes, no habiéndose descrito lesiones leves en ningún paciente del estudio.



Conclusiones

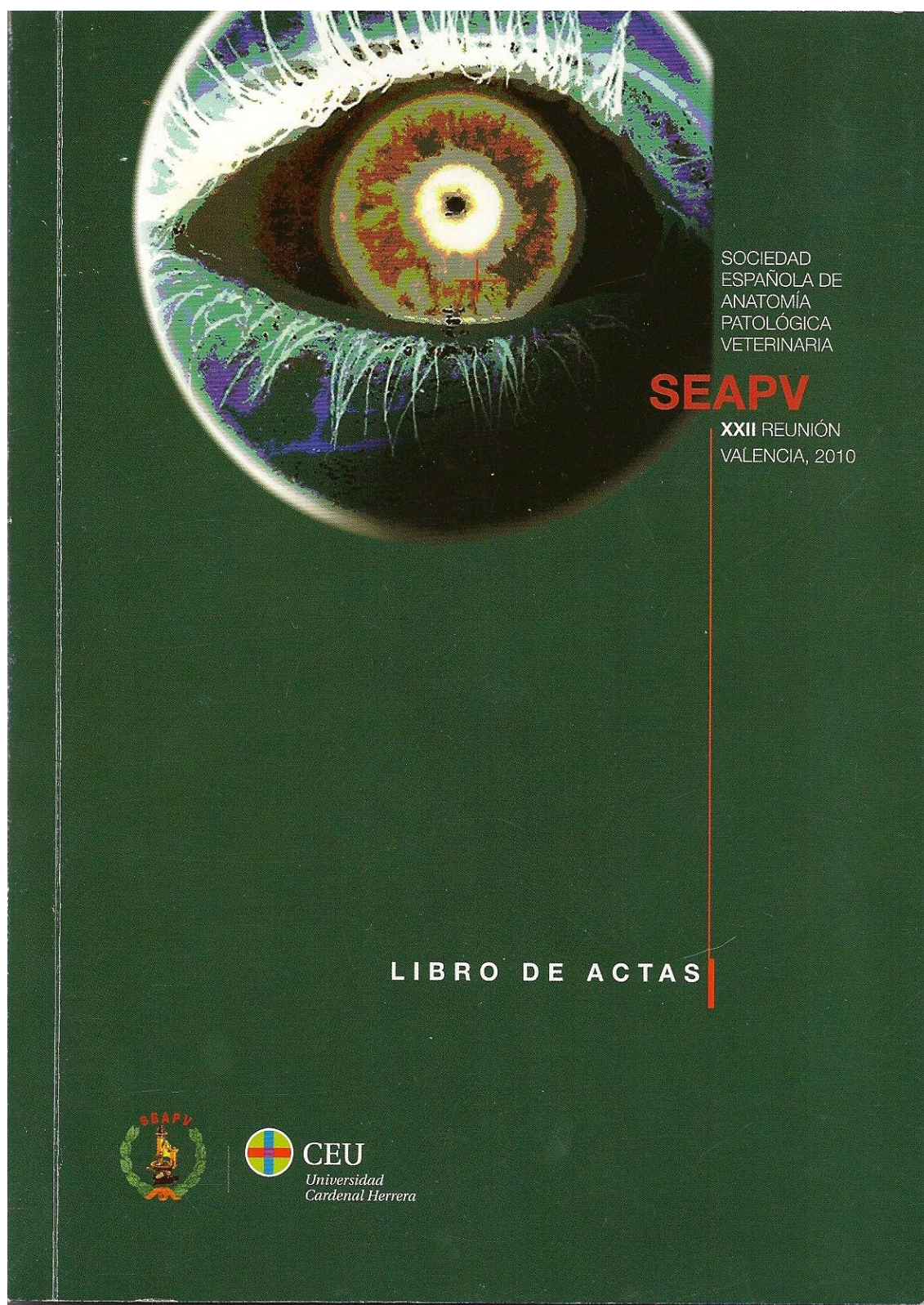
Los resultados de nuestro estudio demuestran que esta enfermedad es característica de perros adultos con edades medias (5 años), y aparece con mayor frecuencia en las razas Yorkshire Terrier y Rottweiler.

Estos pacientes además de ascitis y diarrea crónica de intestino delgado, presentaron una panhipoproteinemia (con proteínas séricas por debajo de 3,5 g/dl), con cociente albúmina/globulina en torno a 1.

Los hallazgos macroscópicos observados en intestino delgado durante la exploración endoscópica muestran la presencia de un proceso inflamatorio crónico con dilataciones linfáticas en mayor o menor grado.

Referencias Bibliográficas

- Craven, M.; Simpson, J.W.; Ridyard, A.E.; Chandler, M.L. (2004): "Canine inflammatory bowel disease: retrospective analysis of diagnosis and outcome in 80 cases (1995-2002). J. Small Anim. Pract., 45: 336-342.
- Day, M.J.; Bilzer, T.; Mansell, J.; Wilcock, B.; Hall, E.J.; Jergens, A.; Minami, T.; Willard, M.; Washabau, R. (2008): "Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from dog and cat: A report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group". J. Comp. Path., 138: S1-S43.
- Washabau, R.; Day, M.J.; Willard, M.; Hall, E.J.; Jergens, A.; Mansell, J.; Minami, T.; Bilzer, T. (2010): "Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals". J. Vet. Intern. Med., 24: 10-26.
- Allenspach, K.; Wieland, B.; Gröne, A. (2007): "Chronic enteropathies in dogs: evaluation of risk factors for negative outcome". J. Vet. intern. Med., 21(4):700-708.



ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR Ki 67 EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE IBD Y LINFOMA ALIMENTARIO EN EL PERRO: ASPECTOS ENDOSCÓPICOS E HISTOPATOLÓGICOS.



¹Carrasco V, ¹Rodríguez-Franco F, ¹Devesa V, ¹Castaño M, ¹Pizarro M, ²Rodríguez-Bertos A
¹Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Hospital Clínico Veterinario. ²Laboratorio VISAVET.
 Universidad Complutense de Madrid. violeta.carrasco@vet.ucm.es

INTRODUCCIÓN

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y el linfoma alimentario son afecciones gastrointestinales comunes en el perro, con una presentación clínica similar que incluye síntomas digestivos crónicos como diarrea, vómitos o pérdida de peso. Por ello, tras realizar un protocolo diagnóstico adecuado para descartar posibles patologías causantes de estos síntomas, IBD y linfoma alimentario son muchas veces los diagnósticos diferenciales que nos quedan¹. El diagnóstico de estas dos enfermedades se basa en datos clínicos que incluyen necesariamente la toma de biopsias y el consecuente estudio histopatológico. Sin embargo, como ya algunos autores han señalado^{2,3,12}, en muchos casos la anatomía patológica no es suficiente para llegar a un diagnóstico claro; incluso se ha sugerido una posible evolución de IBD a linfoma alimentario^{5,7}. Por esta razón sería muy interesante la utilización de herramientas, como la inmunohistoquímica, para llegar a un diagnóstico definitivo. El índice de proliferación celular Ki67 se ha relacionado con el grado de malignidad y la supervivencia en diversas neoplasias, entre las que se encuentra el linfoma multicéntrico canino^{4,6,8}. Este trabajo supone la primera descripción de Ki67 en el diagnóstico diferencial entre IBD y linfoma alimentario en el perro.

MATERIAL Y MÉTODOS

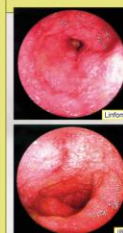
Se han estudiado biopsias endoscópicas de duodeno de 19 perros divididos en tres grupos de estudio: grupo 1- IBD grave (n=5), grupo 2- linfoma intestinal (n=5) y grupo 3- desorden linfoproliferativo (LP) no caracterizado (n=9). Para su inclusión en el grupo 3 se eligieron perros con biopsias que no permitían un diagnóstico claro. Se han evaluado una serie de parámetros endoscópicos e histopatológicos basados en los publicados para IBD^{2,11} y ampliados para el resto de casos. El estudio de la expresión de Ki67 se ha realizado mediante inmunohistoquímica, utilizando la técnica del complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa, con el anticuerpo rabbit anti-Ki-67, clon SP6 (Master Diagnóstica).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	1-IBD	2-LINFOMA	3-DESORDEN LP
Mucosa engrosada	100%	80%	100%
Mucosa irregular	80%	80%	67%
Mucosa congestiva	100%	100%	80%
Erosiones	40%	80%	45%
Mucosa friable	60%	0%	78%

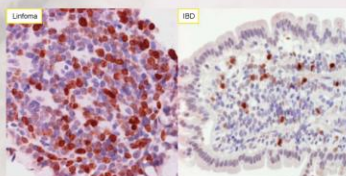
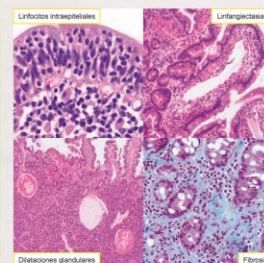
ESTUDIO ENDOSCÓPICO

La imagen endoscópica de la mucosa duodenal no nos permite el diagnóstico diferencial IBD-linfoma. Está descrito que el grado de alteraciones macroscópicas no se corresponden con el grado de lesiones histopatológicas⁹. En nuestros casos la imagen endoscópica es muy similar en los tres grupos. Se trata de lesiones difusas, con una mucosa engrosada, irregular y congestiva, con erosiones más comunes en el linfoma y una mucosa friable más frecuente en el IBD.



ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Nuestros resultados muestran que el estudio de parámetros como la atrofia de vellosidades, dilataciones glandulares, linfangiectasias, fibrosis o linfocitos intraepiteliales no permiten diferenciar entre IBD grave y linfoma (con porcentajes muy similares en los tres grupos), aunque son útiles en el diagnóstico rutinario de IBD^{2,11}. Los perros con linfoma alimentario muestran un infiltrado linfocítico con características claras de malignidad en el caso de los linfomas de células grandes, mientras que éstos no son tan evidentes en los linfomas con diferenciación linfocítica¹⁰. En nuestros casos del grupo 3 es especialmente difícil el diagnóstico, ya que en todos los casos coexistían agrupamientos de linfocitos pequeños y bien diferenciados junto con un infiltrado inflamatorio difuso.



	Índice de proliferación (%)	Desviación típica
1- IBD	10,16	5,91
2- LINFOMA	47,60	21,16
3- DESORDEN LP	22,36	13,99

ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

El índice de proliferación celular (IP) resultó ser menor de 16% en todos los casos del grupo 1 (IBD), mientras que cuatro de los cinco casos del grupo 2 (linfomas) expresaron un IP entre el 30 y el 75%. De los nueve casos incluidos en el grupo 3 (desorden LP), tres de ellos presentaron una expresión mayor del 30%, y el resto entre el 6 y el 20%. Se ha encontrado una diferencia significativa ($p = 0,014$) en el IP entre el grupo de linfomas (47,6%) y el grupo de IBDs (10,16%). En medicina humana existe un estudio que refleja la utilidad de Ki67 para distinguir desórdenes linfoproliferativos benignos y malignos¹. Se trata de una técnica muy recomendable en el ámbito clínico-hospitalario, dado su relativo bajo coste y técnica asequible. En este trabajo se exponen resultados preliminares; sin embargo, podemos afirmar que el IP Ki-67 ha demostrado ser una herramienta de valor en el diagnóstico diferencial IBD-linfoma de biopsias endoscópicas de duodeno.

REFERENCIAS

- Bryant R, Banks P, et al. Ki67 staining pattern as a diagnostic tool in the evaluation of lymphoproliferative disorders. *Histopathology* 2006;48 (5): 505-515.
- Day M, Sizer T, et al. Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *J Comp Pathol* 2008;138 Suppl 1: S1-43.
- Evans S, Bonczymski J, et al. Comparison of endoscopic and full-thickness biopsy specimens for diagnosis of inflammatory bowel disease and alimentary tract lymphoma in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2008;223 (9): 1447-1450.
- Fournel-Fleury C, Magnol JP, et al. Growth fractions in canine non-hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki67 antigen. *J Comp Path* 1987; 117 (1): 61-72.
- Gallford WB, Strombeck DR. Neoplasms of the gastrointestinal tract. APUD tumors, endocrinopathies and the gastrointestinal tract. In: Strombeck's Small Animal Gastroenterology, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996: 519-531.
- Kuipel M, Teske E, et al. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol* 1999;36 (4): 292-300.
- Leibman NF, Larson VS, et al. Oncologic diseases of the digestive system. In: Tams, ed., TR: Handbook of small animal gastroenterology, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2003: 370-415.
- Phillips B, Kasa P, et al. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J Vet Diagn Invest* 2000;12 (2): 111-117.
- Roth L, Leib M, et al. Comparisons between endoscopic and histologic evaluation of the gastrointestinal tract in dogs and cats: 75 cases (1984-1987). *J Am Vet Med Assoc* 1990;196 (4): 635-638.
- Vall T. Hematopoietic system. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, eds. Pathology of Domestic Animals, 5 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007:107-324.
- Washabau R, Day M, et al. Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. *J Vet Intern Med* 2010;24 (1): 10-25.
- Willard M, Jergens A, et al. Interobserver variation among histopathologic evaluations of intestinal tissues from dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 2002;220 (8): 1177-1182.